

UNIVERSITÄT
BAYREUTH

**Charakterisierung der
Phosphofructokinase-Genfamilie in
Arabidopsis thaliana und *Oryza sativa***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalis

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie,

eingereicht an der

Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften

der Universität Bayreuth

von Natalia Hess,

geb. am 18.01.1983

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2010 bis Oktober 2015 in Bayreuth am Lehrstuhl Pflanzengenetik unter Betreuung von Frau Professor Dr. Angelika Mustroph angefertigt.

Dissertation eingereicht am: 12.10.2015

Zulassung durch die Promotionskommission: 21.10.2015

Wissenschaftliches Kolloquium: 14.01.2016

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Stefan Schuster

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Angelika Mustroph	(Erstgutachterin)
-----------------------------	-------------------

PD. Dr. Alfons Weig	(Zweitgutachter)
---------------------	------------------

Prof. Dr. Dirk Schüler	(Vorsitz)
------------------------	-----------

Prof. Dr. Bettina Engelbrecht

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
Summary	1
Zusammenfassung.....	3
1 Einleitung.....	5
1.1 Bedeutung von Hypoxie für Pflanzen	5
1.2 Anpassungsmechanismen an Hypoxie.....	6
1.3 Metabolische Anpassung an Sauerstoffmangel.....	8
1.4 Pyrophosphat als alternative Energiequelle.....	10
1.4.1 Die Funktion der Saccharose-Synthase bei Hypoxie	10
1.4.2 Weitere PPI-abhängige Enzyme	13
1.4.3 Die potentielle Bedeutung der PPI-abhängigen Enzyme bei Reis	14
1.5 Charakterisierung der PFK und PFP	14
1.5.1 Die Rolle der PFP	14
1.5.2 Die Rolle der PFKs	16
1.6 Die Funktion der PF2K und das regulatorische Molekül Fru2,6BP	19
1.7 Zielsetzung.....	21
2 Material und Methoden	23
2.1 Materialien	23
2.1.1 Chemikalien.....	23
2.1.2 Sonstige Verbrauchsmaterialien und Geräte	23
2.1.3 Enzyme	23
2.1.4 Oligonuklotide.....	24
2.1.5 Plasmide.....	24
2.1.6 Bakterienstämme.....	24
2.1.7 Pflanzenmaterial.....	24
2.2 Pflanzenanzucht.....	25
2.2.1 Zusammensetzung der Erde für die Pflanzenanzucht.....	25
2.2.2 Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> und <i>Nicotiana benthamiana</i> unter Standardbedingungen	26
2.2.3 Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> unter sterilen Bedingungen.....	26
2.2.4 Anzucht von <i>Oryza sativa</i>	27
2.2.5 Kultivierung von <i>Oryza sativa</i> -Kallusgewebe	27

2.2.6	Kultivierung von <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	27
2.3	Stressbehandlung von <i>Arabidopsis thaliana</i> und Reis	28
2.3.1	Sauerstoffmangelversuche an <i>Arabidopsis thaliana</i> und <i>Oryza sativa</i>	28
2.3.2	Komplette Überflutung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	28
2.4	Anzucht von Bakterienstämmen	29
2.4.1	Für Kultivierung von Bakterien verwendete Anzuchtmedien	29
2.4.2	Herstellung transformationskompetenter <i>Escherichia coli</i>	29
2.4.3	Hitzeschock-induzierte Transformation von <i>Escherichia coli</i>	30
2.4.4	Herstellung transformationskompetenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	30
2.4.5	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	30
2.5	Biochemische Methoden	31
2.5.1	Extraktion der Phosphofructokinasen und PFPs	31
2.5.2	Konzentrationsbestimmung nach Bradford	31
2.5.3	Bestimmung der PFK- und PFP-Enzymaktivität	31
2.5.4	Bestimmung der ADH-Enzymaktivität	32
2.5.5	Oxidation und Reduktion der Extrakte unter nativen Bedingungen	32
2.5.6	Reduktion der Extrakte unter bedingt denaturierenden Bedingungen	32
2.5.7	Extraktion von Metaboliten	33
2.5.8	Spektrophotometrische Bestimmung von Metabolitgehalten	33
2.5.9	Messung der ATP-Gehalte	34
2.5.10	SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Western Blot	35
2.6	Molekularbiologische Methoden	36
2.6.1	DNA-Extraktion aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	36
2.6.2	DNA-Extraktion aus <i>Oryza sativa</i>	36
2.6.3	Isolierung von Gesamt-RNA	37
2.6.4	Bestimmung von RNA- und DNA-Konzentration	37
2.6.5	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion	37
2.6.6	Polymerasekettenreaktion	37
2.6.6.1	Standard-PCR	38
2.6.6.2	PCR für Klonierung	38
2.6.6.3	PCR für Gateway-Klonierung	38
2.6.6.4	Zielgerichtete Mutagenese-PCR	39
2.6.6.5	Semi-quantitative PCR	39
2.6.7	Restriktionsverdau	39

2.6.8	Agarosegelelektrophorese	40
2.6.9	Aufreinigung von PCR-Fragmenten und Gelextraktion	40
2.6.10	Sequenzierung	41
2.6.11	Infiltration in <i>Nicotiana benthamiana</i>	41
2.6.12	Anreicherung und Behandlung von Chloroplasten aus <i>N. benthamiana</i>	41
2.6.13	Herstellung transgener Pflanzen.....	42
2.6.13.1	Herstellung von RNAi-Konstrukten für <i>Oryza sativa</i> und <i>Arabidopsis thaliana</i>	42
2.6.13.2	Überexpressionskonstrukte in <i>Nicotiana benthamiana</i>	42
2.6.13.3	Transformation von <i>Oryza sativa</i>	43
2.6.13.4	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	44
2.6.13.5	Kreuzung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	44
2.7	Computerprogramme, Datenbankrecherche und Sequenzanalysen.....	45
3	Ergebnisse.....	46
3.1	Analyse der OsPFPβ T-DNA-Insertionsmutante in <i>Oryza sativa</i>	46
3.2	Etablierung der Reistransformation	50
3.3	Analyse der Reis PFPβ RNAi-Konstrukte der T1-Generation	53
3.4	Analyse der OsPFPβ RNAi-Linien in jungen und adulten Pflanzen der T2-Generation	58
3.5	Analyse von <i>Arabidopsis thaliana</i> PFP T-DNA-Insertionsmutanten	62
3.5.1	Aktivität und Transkriptionsanalyse der <i>Arabidopsis thaliana</i> PFP-Einzelmutanten.....	62
3.5.2	Analyse der der <i>Arabidopsis thaliana</i> PFP T-DNA-Insertionsmutanten bei Überflutung.....	64
3.5.3	Herstellung der PFPβ und PFPα-Doppelmutanten in <i>Arabidopsis thaliana</i>	66
3.6	Analyse der PF2K T-DNA-Insertionsmutanten	69
3.7	Phylogenetische Analyse der PFKs.....	71
3.8	Analyse der <i>Arabidopsis thaliana</i> PFK T-DNA-Insertionsmutanten.....	74
3.9	Regulation der PFK5.....	81
3.9.1	Wiederherstellung der PFK5-Aktivität	81
3.9.2	Quantifizierung der heterolog exprimierten <i>Arabidopsis thaliana</i> PFKs.....	82
3.9.3	Redox-abhängige Regulation der heterolog exprimierten <i>A. thaliana</i> PFKs	84
3.9.4	Analyse des CGG(L/I)C-Motivs von PFK3 und PFK5.....	86
3.9.5	Analyse des CXXXXC-Motivs bei PFK5.....	92
4	Diskussion	97
4.1	OsPFPβ ist ein potentiell essentielles Allel	97

4.1.1	Letalität beruht auf der Akkumulation von Zucker	99
4.1.2	Die Bedeutung der PFP für das Überleben von <i>Arabidopsis thaliana</i> bei Überflutung.....	102
4.1.3	Die physiologische Relevanz der PF2K bei Überflutung	104
4.2	Die Überflutungstoleranz vermittelnde Rolle der PFP in <i>Oryza sativa</i> und <i>Arabidopsis thaliana</i>	105
4.3	Die Rolle der PFKs bei Sauerstoffmangel	109
4.4	Die Redox-Regulation der PFK5	110
4.4.1	Das Ferredoxin/Thioredoxin (TRX)-System der Chloroplasten	111
4.4.2	Die strukturellen Eigenschaften der PFK5	114
4.4.3	Das CGG(L/I)C-Motiv ist nicht an der Redox-abhängigen Regulation der PFKs beteiligt.....	115
4.4.4	Das CXXXXC-Motiv ist in die Redox-abhängige Regulation der PFK5 involviert	117
4.4.5	Die PFK5 Aktivität wird durch Licht inhibiert.....	119
4.4.6	Die PFK5 im Vergleich zur Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase.....	120
	Ausblick	124
5	Literaturverzeichnis.....	126
6	Anhang	147
	Danksagung.....	154
	Eidesstattliche Versicherung und Erklärung	155

Abkürzungsverzeichnis

2-cys PRX	2-Cystein Peroxiredoxin
2-PGA	2-Phosphoglycerat
3-PGA	3-Phosphoglycerat
ABA	Abscisinsäure
ACCase	Acetyl-CoA Carboxylase
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
AGPase	ADP-Glucose Pyrophosphorylase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinder-Serum-Albumin
C	Cystein
cDNA	„complementary DNA“ (komplementäre DNA)
CoA	Coenzym A
Col-0	Columbia-0 (Wildtyp: <i>Arabidopsis thaliana</i>)
cv.	Kultivar
Cyt	Cytochrom
Da	Dalton
DAHP Synthase	3-desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat-Synthase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„deoxyribonucleic acid“ (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
et al.	und Mitarbeiter
ERF	<i>ethylene response factors</i>
EtOH	Ethanol
FBPase	Fructose-1,6-Biphosphatase
Fd	Ferredoxin
FKBP13	Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase
FR13A	<i>Flood Resistant 13A</i>

Fru	Fructose
Fru1,6BP	Fructose-1,6-Bisphosphat
Fru2,6BP	Fructose-2,6-Bisphosphat
Fru6P	Fructose-6-Phosphat
FTR	Ferredoxin Thioredoxin Reductase
FW	Frischgewicht
g	Erdbeschleunigung
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	„green fluorescent protein“, grün fluoreszierendes Protein
Glu	Glucose
Glu1P	Glucose-1-Phosphat
Glu6P	Glucose-6-Phosphat
GPX	Glutathion Peroxidase
GWD	Glukan-Wasser-Dikinase
h	Stunden
HA	„Human Influenza Haemagglutinin“
HA-C	C-terminal fusionierte HA-Markierung
HA-N	N-terminal fusionierte HA-Markierung
HEPES	N-2-(Hydroxyethyl)piperazin-N-2-Ethansulfonsäure
HY	Oryza sativa L. ssp. Japonica cv. Hwayoung
kb	kilo Base
Km	Michaeliskonstante
LB	Luria-Bertani
LD50	einen mittlere letale Dosis
LDH	Lactatdehydrogenase
LOES	„low oxygen escape syndrome“
M	Molar (mol/l)
MDH	Malatdehydrogenase
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
mRNA	“messenger RNA” (Boten-RNA)
MS	Murashige und Skoog
NAD	Nicotinamid-adenin-dinukleotid
NADH	Reduziertes Nicotinamid-adenin-dinukleotid

NADP	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NADPH	Reduziertes Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NIP	Oryza sativa L. ssp. Japonica Kultivar Nipponbare
NTRC	NADPH-abhängigen Thioredoxin Reductase C
OD	Optische Dichte
PBS-T	„Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween 20
PC	Plastocyanin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDC	Pyruvat-Decarboxylase
PEP	Phosphoenolpyruvat
PF2K	6-Phosphofructo-2-Kinase/Fru2,6-Bisphosphatase
PFK	Phosphofructokinase
PFP	Pyrophosphate:Fructose-6-Phosphat-Phosphotransferase
PG	Phosphatidylglycerol
Pi	Phosphat
PK	Pyruvat-Kinase
PPDK	Pyruvat-Phosphate-Dikinase
PPi	Pyrophosphat
PPiase	Pyrophosphatase
PQ	Plastoquinon
PRK	Phosphoribulokinase
PRX-Q	Peroxiredoxin Q
PS	Photosystem
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	„ribonucleic acid“ (Ribonukleinsäure)
RNAi	“RNA interference”
Rnase	Ribonuclease
rpm	Runden pro Minute
RuBisCO	Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase
S	Serin
SBPase	Sedoheptulose-1,7-Bisphosphatase
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

ssp.	Subspezies
Sub1A	<i>SUBMERGENCE1A-1</i>
SuSy	Saccharose-Synthase
TAE Puffer	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung Tween 20
T-DNA	Transfer-DNA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TES	N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminoethansulfonsäure
TR BAMY	Thioredoxin-abhängige Beta-Amylase
Tris	Tri-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
Tris-HCl	Tris-Puffer, pH mit Salzsäure eingestellt
TRN	Thioredoxin
TRX-System	Ferredoxin/Thioredoxin-System
TT	Natriumtetrathionat
U	„Unit“ (Einheit der Enzymaktivität)
UDP	Uridindiphosphat
UDPGlu	Uridindiphosphat-Glucose
UGPase	UDP-Glucose-Pyrophosphorylase
UTP	Uridintriphosphat
UTR	„untranslated region“, untranslatierter Bereich
UV	Ultraviolettstrahlung
vATPase	vakuoläre Protonen-pumpende ATPase
vPPase	tonoplastidäre Protonen-transportierende PPase
WT	Wildtyp
β-ME	β-Mercaptoethanol

Summary

Oxygen deficiency is a severe stress for the plant and results in an energy crisis. Hypoxia can occur naturally in plant tissues with high meristematic activity but may also be a result of flooding. Plants developed numerous genetic, metabolic and anatomical adaptations to escape or endure low oxygen. Adventitious root growth or aerenchyma formation are some examples of anatomical modifications to help the plant survive submergence. On the cellular level, the mitochondrial respiration is inhibited due to the oxygen limitation and ATP content decreases dramatically. To cope with the energetic crisis, the expression of genes coding for proteins involved in fermentation, like the alcohol dehydrogenase and pyruvate decarboxylase (PDC), is induced. During hypoxic stress, Pyrophosphate (PPi) is considered as an alternative energy source to ATP. While it is a byproduct of many biochemical processes, PPi-dependent enzymes use PPi instead of ATP for the phosphorylation of their target molecules. Several of these enzymes are induced during hypoxia in rice including the pyrophosphate-fructose 6-phosphate-1-phosphotransferase (PFP).

The aim of this study was to investigate the role of the PFP in the model organisms *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* under oxygen deficiency. First of all, rice transformation was established and PFP RNAi mutants were created in rice. Comparison of the metabolism of PFP mutants in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* should reveal the physiological relevance of the enzyme in these organisms. Therefore, carbohydrate contents and the survival under submergence were examined and PFP/PFK activities were determined. The data suggest that in contrast to *Arabidopsis thaliana*, the PFP of rice might have an essential role for the viability of the plant.

Furthermore, functional analysis of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PF2K), an enzyme producing fructose-2,6-bisphosphate (Fru2,6BP) was performed. Fru2,6BP is a potent activator of the PFP. The metabolite content, PFP activities and survival rate were assessed in two independent *A. thaliana* T-DNA deletion mutants under submergence to investigate the role of PFP for the survival of the plants in hypoxic conditions.

Additionally, phosphofructokinase (PFK), an enzyme of the glycolysis is phosphorylating fructose-6-phosphate using ATP. Several *Arabidopsis thaliana* PFKs are induced under oxygen deficiency, showing a similar expression pattern to the PDC, a marker gene of hypoxic stress response. T-DNA insertion lines for *Arabidopsis thaliana* PFKs were analyzed. It was shown that all *Arabidopsis thaliana* PFKs and the PF2K probably do not contribute to the fitness of the plant under hypoxia.

The chloroplast contains a complex redox regulation system harnessing the reducing power of the photosynthesis in order to modify the activity of many plastidic proteins by reducing their disulfide bridges. Several previous published studies showed that PFK activity in *Pisum sativum* and *Spinacia oleracea* chloroplasts was regulated by light. During this PhD project the PFK5 amino acid sequence was analysed. Using site directed mutagenesis and changing cysteines to serines, two cysteines involved in the light-dependent redox regulation of the enzyme were identified. Protein modelling revealed the localization of the cysteines on a flexible loop emerging out of the surface of the PFK5 protein, being easily accessible to redox-regulating proteins such as thioredoxins. Further analysis showed that PFK5 activity was sensitive to the reducing agent Dithiothreitol (DTT) and modulated by light.

Zusammenfassung

Sauerstoffmangel ist ein Stressfaktor, der bei Pflanzen zu einer Energiekrise führt. Dieser Stress kann entwicklungsbedingt in pflanzlichen Geweben mit hoher meristematischer Aktivität vorkommen, ist jedoch auch eine Folge von Überflutung. Im Laufe der Evolution entwickelten Pflanzen zahlreiche genetische, metabolische und anatomische Anpassungsmechanismen, die ihnen dabei helfen, Sauerstoffmangel zu ertragen oder sich diesem Stress zu entziehen. Das Wachstum von Adventivwurzeln oder die Ausbildung von Aerenchymen sind zwei Beispiele für morphologische Modifikationen, die die Überflutungstoleranz der Pflanze erhöhen können. Aufgrund des Sauerstoffmangels wird auf zellulärer Ebene die mitochondriale Respiration eingeschränkt, wodurch der ATP-Gehalt drastisch sinkt. Um diese Energiekrise zu bewältigen, wird die Expression von Genen, die für Proteine kodieren, die in die Fermentation involviert sind, induziert. Dazu zählen die Alkoholdehydrogenase und die Pyruvat-Decarboxylase (PDC). Pyrophosphat (PPi) ist ein Nebenprodukt vieler biochemischer Prozesse und wird als alternative Energiequelle bei Sauerstoffmangel angesehen. Die PPi-abhängigen Enzyme benutzen PPi anstatt ATP, um die jeweiligen Moleküle zu phosphorylieren. Mehrere PPi-abhängige Enzyme werden bei Hypoxie in Reis induziert, dazu zählt auch die Pyrophosphate:Fructose-6-Phosphat-Phosphotransferase (PFP).

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der PFP in den Modellorganismen *Oryza sativa* und *Arabidopsis thaliana* bei Sauerstoffmangel zu untersuchen. Zuerst wurden die Transformation von Reis etabliert und anschließend PFP RNAi-Mutanten in Reis hergestellt. Der Vergleich der *Oryza sativa* PFP RNAi-Mutanten mit *Arabidopsis thaliana* PFP-Deletionsmutanten sollte die physiologische Relevanz dieses Proteins für beide Organismen aufzeigen. Zu diesem Zweck wurden bei den Mutanten die Metabolitgehalte, die Überlebensraten bei Überflutung und die PFP/PFK-Aktivitäten bestimmt. Die im Rahmen dieser Arbeit gesammelten Daten weisen darauf hin, dass die PFP in Reis im Gegensatz zu *Arabidopsis thaliana* eine essentielle Rolle spielen könnte.

Darüber hinaus wurde die 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fru2,6-Bisphosphatase (PF2K) funktionell analysiert. Dieses Enzym produziert Fructose-2,6-Bisphosphat (Fru2,6BP), einen starken Aktivator der PFP. Die Messung von Metabolitgehalten, PFP-Aktivitäten und dem Überleben bei Überflutung sollte Erkenntnisse über die Relevanz dieses Enzyms bringen.

Daneben wurde die Phosphofructokinase (PFK), ein Enzym der Glycolyse, das ATP zum Phosphorylieren von Fructose-6-Phosphat (Fru6P) verwendet, untersucht. Die Expression einiger *Arabidopsis thaliana* PFKs wird bei Sauerstoffmangel induziert. Das Expressionsmuster dieser PFKs korrespondiert mit der PDC, einem Markergen der Antwort

auf Sauerstoffmangel. Mehrere T-DNA-Insertionslinien wurden untersucht, dabei konnte gezeigt werden, dass alle *Arabidopsis thaliana* PFKs und die PF2K wahrscheinlich nicht zum Überleben der Pflanze bei Sauerstoffmangel beitragen.

Der Chloroplast enthält ein komplexes System zur Redox-Regulation. Dabei nutzt er die Reduktionskraft der Photosynthese, um die Disulfid-Brücken von Proteinen zu reduzieren und dadurch die Aktivität dieser Proteine zu modifizieren. In Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die PFK-Aktivität bei Chloroplasten von *Pisum sativum* und *Spinacia oleracea* durch Licht verringert wurde. Im Verlauf dieser Promotionsarbeit wurden in der PFK5 durch vergleichende Sequenzanalysen und die zielgerichtete Mutagenese von Cysteinen zu Serinen die an der Regulation beteiligten Cysteine identifiziert. Anhand einer Strukturvorhersage der PFK5 konnten die Cysteine in einer flexiblen Windung an der Oberfläche des Proteins lokalisiert werden. Dort sind sie leicht für Redox-regulierende Proteine wie Thioredoxin zugänglich. Darüber hinaus war die PFK5-Aktivität gegenüber dem Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT) sensitiv und wurde durch Licht modifiziert.

1 Einleitung

1.1 Bedeutung von Hypoxie für Pflanzen

Bei Hypoxie werden Gewebe und Zellen mangelhaft mit Sauerstoff versorgt; dabei definierten Fukao und Bailey-Serres (2004) Hypoxie als eine Sauerstoffkonzentration, bei der die ATP-Produktion über die mitochondriale Respiration eingeschränkt ist. Bereits bei Sauerstoffkonzentrationen unter 8 % ist die mitochondriale Respiration um 40 % inhibiert (Geigenberger et al., 2000). Weil Pflanzen obligat aerobe und sessile Organismen sind, haben sie im Laufe der Evolution Anpassungsmechanismen entwickelt, um unter hypoxischen Bedingungen zu überleben. Außerdem besitzen sie im Gegensatz zu Tieren kein spezialisiertes respiratorisches Organ oder aktives Verteilungssystem für Sauerstoff. In Geweben mit gering ausgeprägtem Interzellularsystem und hoher meristematischer Aktivität, wie zum Beispiel bei dem Wurzelmeristem (Ober und Sharp, 1996) oder bei Samen von Hülsenfrüchten (Rolletschek et al., 2002) und dem Phloem (van Dongen et al., 2003), sind niedrige Sauerstoffkonzentrationen ein häufig auftretender Zustand. Diese gewebe- und entwicklungsspezifischen Phänomene bestimmter Pflanzen unterscheiden sich von den in der Umwelt der Pflanze auftretenden und allgemein zu hypoxischen Bedingungen führenden Ereignissen. Neben gefrierendem Boden, Bodenverdichtungen und Mikroorganismen führen vor allen Überflutungen zur Hypoxie in Pflanzen. Die Diffusionsrate von Sauerstoff in Wasser ist 10.000 mal niedriger als in Luft, der Diffusionskoeffizient von Sauerstoff in Luft beträgt $0,21 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Dieser sinkt auf $2,38 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ im Wasser ab (Armstrong, 1979). Damit ist die Aufnahme von Sauerstoff durch die überflutete Pflanze erheblich verringert. Darüber hinaus akkumulieren Gase wie CO_2 und Ethylen verstärkt im Gewebe der Pflanze (Jackson, 1985; Banga et al., 1996; Visser et al., 1996). Anoxie ist laut Drew (1997) ein Zustand, bei dem aufgrund des geringen Sauerstoffpartialdrucks die ATP-Produktion über die oxidative Phosphorylierung im Mitochondrium fast komplett inhibiert wird und die Energiegewinnung nur über die Glycolyse und Fermentation möglich ist.

Neben der primären Sauerstoffunterversorgung sind die Pflanzen bei Überflutung mit zusätzlichen Problemen konfrontiert. Bei Staunässe, starkem Regen oder Überflutung füllen sich die Bodenporen mit Wasser, wobei die im Boden lebenden Mikroorganismen zuerst den Sauerstoff verbrauchen. Durch anschließende anaerobe oxidative Prozesse sinkt das Redoxpotential im Boden, was in einer Veränderung des pH-Wertes resultiert (Ponnamperuma, 1972). Einer der ersten oxidativen Prozesse ist die Denitrifikation von Nitrat zu atomarem Stickstoff oder Ammonium. Dieser Vorgang kann zu einer Verknappung von Nitrat im Boden führen (Laanbroek, 1990; Liesack et al., 2000). Die weitere Senkung des Redoxpotentials und der Verbrauch von Nitrat als terminalem Elektronenakzeptor führt zur

anschließenden Reduktion von Stoffen wie Mangan, Eisen oder Schwefel. So entstehen Phytotoxine, die das Wurzelwachstum beeinträchtigen oder sogar letal für die Pflanze sein können (Jackson und Colmer, 2005).

1.2 Anpassungsmechanismen an Hypoxie

Eine Vielzahl von Pflanzen ist sehr sensitiv gegenüber Überflutung und den damit einhergehenden hypoxischen Bedingungen. In Abhängigkeit von der Pflanzenspezies erfolgen bei der Anpassung an Sauerstoffmangel sowohl metabolische und morphologische Veränderungen als auch Modifikationen der Genexpression (z.B. Mertens et al., 1990; Lorbiecke und Sauter, 1999; Lasanthi-Kudahettige et al., 2007; Mühlenbock et al., 2007). Damit ist es den Pflanzen möglich, gewisse Zeiträume partieller oder kompletter Überflutung zu überleben. So wurden *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen bei einem Tag/ Nachtrhythmus von 9 Stunden Licht komplett überflutet. Dabei zeigten die verschiedenen untersuchten Ökotypen eine mittlere letale Dosis (LD₅₀) von 15 bis 21 Tagen (Vashisht et al., 2011). Bei der überflutungstoleranten Pflanze *Rorippa sylvestris* konnte dagegen noch nach 100 Tagen unter Langtagbedingungen und kompletter Überflutung eine Überlebensrate von 100 % beobachtet werden (Akman et al., 2012). Im Gegensatz zur überflutungssensitiven *Arabidopsis thaliana* ist *Oryza sativa* (Reis) eine semiaquatische, überflutungstolerante Pflanze. *Oryza sativa* und *Arabidopsis thaliana* sind somit zwei Modellorganismen, die in ihrer Überflutungstoleranz stark variieren. Dabei wurden bereits in beiden Pflanzenspezies unterschiedliche Anpassungsmechanismen beobachtet (z.B. Raskin und Kende, 1984; Kende et al., 1998; Klok et al., 2002; Gonzali et al., 2005; Lasanthi-Kudahettige et al., 2007).

Grundsätzlich gibt es nach Bailey-Serres und Voisenek (2008) bei Überflutung zwei Anpassungsstrategien. Bei dem *low oxygen escape syndrome* (LOES) stimulieren die Pflanzen die Elongation von Blättern, Petiolen oder Stängeln. Gleichzeitig wird die Bildung von Aerenchymen begünstigt. Dadurch gelingt es den Pflanzen, Teile der Blätter über der Wasseroberfläche zu halten und somit die Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Während einer Überschwemmung entwickeln viele intolerante Flachland- sowie Tiefwasser-Reiskultivare das LOES. In der Regel wird die Elongation durch das in den hypoxischen Geweben akkumulierende Ethylen ausgelöst. Dabei resultiert die Akkumulation von Ethylen in einer Produktion von bioaktiver Gibberellinsäure. Zielgene der Gibberellinantwort sind in die Überflutungs-bedingte Elongation der Pflanze involviert (Bailey-Serres und Voisenek, 2008). Intolerante Flachlandreis-Sorten werden in Feldern mit 5 bis 25 cm hoch stehendem Wasser angebaut und sind besonders für von Monsunregen ausgelösten Überschwemmungen anfällig. Dabei verfügen sie über eine schlechte bis moderate Elongationsrate. Im Gegensatz

dazu weisen Tiefwasserreis-Sorten eine hohe Elongationsrate auf (Catling, 1992). So kann Tiefwasserreis bei Überflutung bis zu 25 cm am Tag wachsen und bis zu 7 Meter lang werden (Kende et al., 1998). Damit ist es den Reispflanzen möglich, in Wassertiefen von über 50 cm bis zu einem Monat zu überleben (Catling, 1992). Das im Vergleich zum Flachlandreis erhöhte Streckungswachstum von Tiefwasserreis wird durch die Transkriptionsfaktoren der *ethylene response factors* (ERF)-Familie *SNORKEL1* und *SNORKEL2* verstärkt (Hattori et al., 2009). Neben dem LOES gibt es die *quiescence*-Strategie. Diese Strategie wird durch den ERF-Transkriptionsfaktor *SUBMERGENCE1A-1* (Sub1A-1) vermittelt. Überflutungstolerante Reissorten, wie zum Beispiel *Flood Resistent 13A* (FR13A), enthalten das SUB1A-1 im Genom. Die Expression dieses Gens wird durch das bei Überflutung in den Geweben akkumulierende Ethylen induziert. Dabei wird das Streckungswachstum verringert und damit der Verbrauch der Kohlenhydratreserven verlangsamt (Fukao et al., 2006; Fukao und Bailey-Serres, 2008). Diese energiesparende Dormanzphase erlaubt es den Reispflanzen, bis zu 2 Wochen kompletter Überflutung zu tolerieren (Xu et al., 2006), und ermöglicht ein schnelleres Erholen nach dem Zurückziehen des Wassers (Perata und Voesenek, 2007).

Neben dem gerade beschriebenen, durch die ERF-Transkriptionsfaktoren kontrollierten Streckungswachstum gibt es weitere Mechanismen der morphologischen Adaptation an Überflutung. Dazu gehören die Ausbildung von Aerenchymen und Adventivwurzeln. Aerenchyme sind gasgefüllte Zwischenräume in den Blättern, Wurzeln und Stängeln von Pflanzen, die bei Überflutung die Verteilung von Sauerstoff innerhalb der Pflanze erleichtern. In vielen Feuchtgebietspflanzen sind Aerenchyme bereits konstitutiv vorhanden, können bei Überflutung jedoch zusätzlich induziert werden (Evans, 2004; Colmer und Voesenek, 2009). Nach Drew et al. (2000) induziert das in der Pflanze akkumulierende Ethylen den programmierten Zelltod, wodurch es zur Ausbildung von Aerenchymen kommt. Eine zusätzliche morphologische Adaptation ist die Ausbildung von Adventivwurzeln. Diese substituieren bei Überflutung die basalen Wurzeln und versorgen die Pflanze mit Wasser und Nährstoffen. Aufgrund der bei der Überflutung auftretenden Hypoxie ist die basale Wurzel durch die verminderte respiratorische Energieversorgung dazu nicht mehr in der Lage. Der Anpassungsmechanismus der Adventivwurzelausbildung ist in den Reispflanzen angelegt, muss jedoch durch äußere Faktoren induziert werden (Lorbiecke und Sauter, 1999; Mergemann und Sauter, 2000; Visser und Bögemann, 2006; Steffens et al., 2012).

Obwohl die morphologische Anpassung an hypoxische Bedingungen im Vergleich zu Reis bei *Arabidopsis thaliana* nicht so deutlich ist, konnten Mühlenbock et al. (2007) bei Sauerstoffmangel die Ausbildung von Aerenchymen in Hypokotylen beobachten. Aerenchyme konnten bei 12 Wochen-alten *Arabidopsis*-Pflanzen nach acht Tagen Überflutung nachgewiesen werden. Bis heute sind wenige Studien bekannt, die sich mit der

morphologischen Anpassung von *Arabidopsis thaliana* bei Überflutung beschäftigen. Vashisht et al. (2011) untersuchten die Überlebensrate verschiedener *Arabidopsis thaliana* Ökotypen. So zeigten nach drei Tagen Überflutung in Dunkelheit Ökotypen mit einem geringeren relativen Streckungswachstum der Petiolen eine verringerte Überlebensrate (Vashisht et al., 2011).

1.3 Metabolische Anpassung an Sauerstoffmangel

Bei Sauerstoffmangel finden sowohl bei *Arabidopsis thaliana* als auch bei Reis metabolische Anpassungen statt. Unter normoxischen Bedingungen wird der Energiebedarf der Pflanze über die ATP-Produktion der oxidativen Phosphorylierung im Mitochondrium gedeckt, wobei Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor dient. Bei diesem Prozess werden je Mol Glucose 30 bis 36 Mol ATP generiert. Unter hypoxischen Bedingungen steht der oxidativen Phosphorylierung nicht mehr genügend Sauerstoff zu Verfügung, und die Pflanzen stellen ihren Metabolismus von mitochondrialer Atmung auf Fermentation um. Sowohl die Expression als auch die Aktivität an der Fermentation beteiligter Proteine sind induziert (z.B. Roberts et al., 1989; Umeda und Uchimiya, 1994; Dolferus et al., 1997). Gibbs et al. (2000) beschrieben, dass die Expression von Alkoholdehydrogenase (ADH), Pyruvat-Decarboxylase (PDC), Pyrophosphate:Fructose-6-Phosphat-Phosphotransferase (PFK) und Phosphofructokinase (PFK) in Koleoptilen von Reis nach 5 Tagen Anoxie erhöht ist.

Zu Beginn einer Hypoxie wird das Endprodukt der Glycolyse Pyruvat zu Laktat umgewandelt. Dies führt jedoch zu einer Acidose des Cytosols und einem Absinken des pH-Wertes (Bailey-Serres et al., 1988; Roberts et al., 1984). Mit zunehmender cytosolischer Acidose kommt es in Pflanzen zum Integritätsverlust der Vakuole und zum unkontrollierten Austritt von Protonen in das Cytosol. Der Integritätsverlust ist eine wesentlicher Grund für das Absterben der Pflanzenzellen (Davies et al., 1974; Roberts et al., 1984; Felle, 2005). Der Grad der cytosolischen Ansäuerung kann zwischen verschiedenen Spezies stark schwanken. So wurde für hypoxisch intolerante Pflanzen wie *Zea mays* nach eintretender Anoxie in Wurzelspitzen über ein Absinken des pH-Wertes von 7,5 auf 6,8 berichtet (Roberts et al., 1989). Ein Vergleich von intolerantem Weizen und tolerantem Reis hat gezeigt, dass der pH-Wert bei Sauerstoffmangel in Reis von pH 7,4 auf 7,0 absank, während in Weizen der pH-Wert von 7,4 auf 6,6 fiel. Die Autoren folgerten, dass der stärkerer Abfall des pH-Wertes im Weizen zu einer verringerten Toleranz gegenüber hypoxischen Bedingungen führt (Menegus et al., 1991; Kulichikhin et al., 2007).

Mit sinkendem cytosolischen pH erfolgt jedoch eine Annäherung an das katalytische Optimum der PDC. Erst dann wird die PDC aktiv und die alkoholische Gärung favorisiert (Lee und Langston-Unkefer, 1985; Fukao und Bailey-Serres, 2008). Die PDC wandelt das Pyruvat zu

Acetaldehyd um. Das für die Pflanze hochtoxische Acetaldehyd (Perata und Alpi, 1991) wird anschließend durch die ADH zu Ethanol verstoffwechselt. Diese Vorgänge dienen der Regeneration des reduzierten NADH zu NAD⁺. Beide Enzyme sind Teil der alkoholischen Gärung und gut charakterisierte genetische und biochemische Marker für die Anpassung an Hypoxie (Dennis et al., 2000; Ismond et al., 2003). Die ATP-Ausbeute ist bei der anaeroben Energiegewinnung im Vergleich zur oxidativen Phosphorylierung jedoch deutlich verringert. Pro Mol Glucose werden lediglich 2 bis 4 Mol ATP produziert. Dies führt kurz nach Eintritt des Sauerstoffmangels zu einer deutlichen Reduktion des ATP-Gehaltes innerhalb der Zelle (z.B. Mustroph et al., 2009; Mugnai et al., 2011).

Um die Diskrepanz in der Energiebilanz auszugleichen, konnte in verschiedenen Pflanzenspezies der Pasteur-Effekt beobachtet werden. Der Pasteur-Effekt ist ein weit verbreitetes Phänomen, bei dem die Rate der Glycolyse erhöht wird, um die hypoxisch bedingte verringerte Energiegewinnung zu kompensieren (Turner, 1951; Neal und Girton, 1955; Hole et al., 1992). Die Intensität des Pasteur-Effektes ist jedoch gewebe- und speziesspezifisch. So konnten Summer et al. (2000) im Stängel der anoxisch behandelten monokotyledonen Wasserpflanze *Potamogeton pectinatus* eine 6-fache Induktion der Glycolyserate beobachten. Bei einem Vergleich zweier Reiskultivare konnten Gibbs et al. (2000) in anoxischen Koleoptilen des Reiskultivars Calrose eine 1,4 bis 1,7-fache Induktion der Glycolyserate ermitteln, wohingegen die Koleoptilen des Reiskultivars IR22 keinen Pasteur-Effekt aufwiesen. Da Pflanzen lediglich eine limitierte Menge an gespeicherten Kohlenhydraten besitzen, kann auf lange Sicht ein niedriger ATP-Gehalt nicht durch eine erhöhte Glycolyserate kompensiert werden (Mustroph et al., 2014).

Der sinkende ATP-Gehalt und das damit einhergehende Energiedefizit resultiert in einer Inhibition des pflanzlichen Wachstums (Johnson et al., 1989). Neben Gärungsenzymen wie der PDC und der ADH wird bei Sauerstoffmangel zur zusätzlichen Mobilisierung von gespeicherter Stärke die Expression und Aktivität der Amylase induziert (Perata et al., 1992; Guglielminetti et al., 1995; Loreti et al., 2003). So konnten Perata et al. (1992) im Vergleich zwischen Reis und Weizen zeigen, dass die Induktion der Amylase unter anoxischen Bedingungen im Endosperm des toleranten Reiskeimling 5-fach höher war als beim intoleranten Weizen. Der Weizenkeimling war bei Sauerstoffmangel im Vergleich zu Reis nicht in der Lage, Stärke zu mobilisieren, und damit nicht imstande zu keimen (Perata et al., 1992). Des Weiteren wird zum Zwecke der Energiekonservierung bei Hypoxie die Expression von Genen reduziert, die bei der Nukleotid- und Proteinbiosynthese, dem Zellwandaufbau und dem sekundären Metabolismus eine Rolle spielen (van Dongen et al., 2009; Mustroph et al., 2009, 2010).

1.4 Pyrophosphat als alternative Energiequelle

Pyrophosphat (PPi) ist ein Nebenprodukt vieler biosynthetischer Prozesse. Es wird bei der DNA-Polymerisation, Proteintranslation oder bei der Proteinregulation freigesetzt. Abhängig vom Gewebe kann die PPi-Konzentration im Cytosol zwischen 0,2 mM (Takeshige und Tazawa, 1989; Maeshima, 2000) und 0,5 mM (Plaxton und Tran, 2011) schwanken. In Pflanzen beschränkt sich die Majorität der Pyrophosphatase (PPiase)-Aktivität auf die Plastiden, die einen sehr niedrigen PPi-Gehalt aufweisen und bei denen PPi hauptsächlich bei der Stärkesynthese über die Adenosindiphosphat (ADP)-Glucose-Pyrophosphorylase entsteht (Weiner et al., 1987). Nach Weiner et al. (1987) weist das Cytosol hingegen keine PPiase-Aktivität auf, so kann das aus biosynthetischen Prozessen hervorgehende PPi im Cytosol akkumulieren. Darüber hinaus konnte in Spezies wie *Oryza sativa*, *Arum maculatum* oder *Pisum sativum* gezeigt werden, dass die PPi-Konzentration, im Gegensatz zum sinkendem ATP-Gehalt, bei Sauerstoffmangel konstant bleibt (Dancer und Rees, 1989; Kato-Noguchi, 2002).

1.4.1 Die Funktion der Saccharose-Synthase bei Hypoxie

Da die Fermentation sehr ineffizient ist, werden in der Pflanze andere energiekonservierende Prozesse induziert. Hierzu zählt der Abbau von Saccharose. Grundsätzlich wird Saccharose unter normoxischen Bedingungen durch die Invertase zu Glucose (Glu) und Fructose (Fru) metabolisiert. Die anschließende Phosphorylierung von Glu und Fru durch die Hexokinase verbraucht dabei 2 Mol ATP. Die Saccharose-Synthase (SuSy) ist in Pflanzen das Startenzym eines alternativen PPi-abhängigen Reaktionsweges, dabei verstoffwechselt die SuSy Saccharose zu Uridindiphosphat-Glucose (UDPGlu) und Fru. Unter Verbrauch von einem PPi wird anschließend durch die UDP-Glucose-Pyrophosphorylase (UGPase) UDPGlu zu Glucose-1-Phosphat (Glu1P) dephosphoryliert und das entstandene Uridintriphosphat (UTP) wird zum Phosphorylieren der Fructose verwendet. Bei diesem alternativen Reaktionsweg werden pro Mol metabolisierter Saccharose 1 Mol PPi verbraucht (Abbildung 1).

Sowohl Expression, Proteinmenge als auch die Aktivität der SuSy sind unter Sauerstoffmangel in verschiedenen Spezies erhöht. Baud et al. (2004) berichteten, dass die Genexpression von zwei Isoformen der SuSy (*AtSUS1* und *AtSUS4*) in *Arabidopsis thaliana* bei Hypoxie induziert ist. Daneben konnten Bieniawska et al. (2007) unter anoxischen Bedingungen erhöhte Proteinmengen dieser Isoformen in Wurzeln beobachten. Zudem war die Doppelmutante dieser beiden Isoformen im Vergleich zum Wildtyp nach Überflutung erheblich beeinträchtigt (Bieniawska et al., 2007). Ähnliche Veränderungen wurde unter hypoxischen Bedingungen für *Zea mays* und *Oryza sativa* beobachtet (Bailey-Serres et al., 1988; Ricard et al., 1991; Zeng

et al., 1999). Auf der anderen Seite konnten Zeng et al. (1999) zeigen, dass die Expression der ATP-abhängigen Invertase bei Sauerstoffmangel in Wurzel von *Zea mays* inhibiert wird. Des Weiteren konnten Gegenberger et al. (2000) nach 24 Stunden Anoxie eine komplette Inhibition der Invertase-Aktivität in Kartoffelscheiben nachweisen. Speziesübergreifend sind die Expression, Aktivität und Proteinmenge der PPI-abhängigen SuSy bei Sauerstoffmangel erhöht und die Metabolisierung der Saccharose wird über den alternativen energiekonservierenden Weg bevorzugt (z.B. Zeng et al., 1998; Ricard et al., 1998; Marañá et al., 1990; Bailey-Serres und Voesenek, 2008)

Während der Beitrag der SuSy zur Überflutungstoleranz weitergehend akzeptiert ist, gibt es drei weitere PPI-abhängige Enzyme, die einen potentiellen Einfluss auf die Toleranz von speziell an Überflutung angepassten Pflanzen haben könnten. Ihre Bedeutung ist jedoch noch unklar.

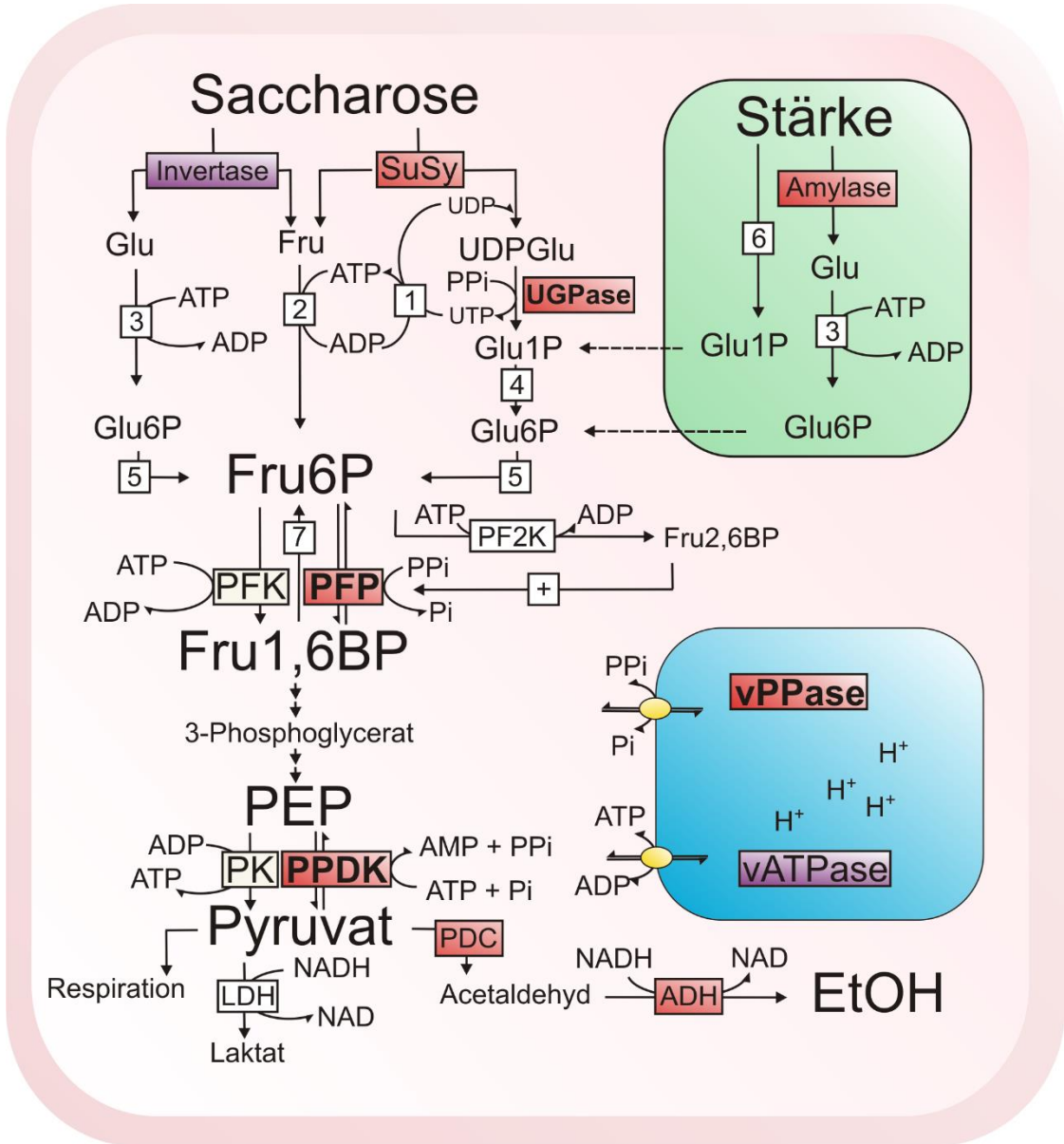


Abbildung 1: Übersicht über den primären pflanzlichen Metabolismus. Bei Überflutung in Reis induzierte Expression von Genen ist rot unterlegt, inhibierte Genexpression ist lila unterlegt (modifiziert nach (Carystinos et al., 1995; Mustroph et al., 2005; Bailey-Serres und Voesenek, 2008; Mustroph et al., 2014). Zusätzlich sind die alternativen PPI-abhängigen Enzyme fett geschrieben. Abkürzungen: SuSy, Saccharose-Synthase; UGPase, UDP-Glucose-Pyrophosphorylase; UDPGlu, Uridindiphosphat-Glucose; PFK, Phosphofructokinase; PFP, Pyrophosphate:Fructose-6-Phosphat-Phosphotransferase; PK, Pyruvat-Kinase; PPK, Pyruvat-Phosphate-Dikinase; PDC, Pyruvat-Decarboxylase; LDH, Lactatdehydrogenase; ADH, Alkoholdehydrogenase; vPPase, tonoplastidäre Protonen-transportierende PPase; vATPase, vakuoläre Protonen-pumpende ATPase; PF2K, Phosphofructo-2-Kinase/Fru2,6Bisphosphatase; Glu, Glucose; Fru, Fructose; Glu1P, Glucose-1-Phosphat; Glu6P, Glucose-6-Phosphat; Fru6P, Fructose-6-Phosphat; Fru1,6BP, Fructose-1,6-Bisphosphat; PEP, Phosphoenolpyruvat; EtOH, Ethanol; 1, Nukleosid-Diphosphat-Kinase; 2, Hexose-Phosphat-Isomerase; 3, Hexokinase; 4, Phosphoglucosemutase; 5, Phosphoglucose-Isomerase; 6, Stärke-Phosphorylase 7 Fructose-1,6-Bisphosphatase.

1.4.2 Weitere PPi-abhängige Enzyme

Zu den weiteren PPi-abhängigen Enzymen in der pflanzlichen Zelle zählt die tonoplastidäre Protonen-transportierende Pumpe (vPPase). Unter Verbrauch von PPi transportiert dieses Enzym Protonen aus dem Cytosol in die Vakuole. Die vPPase ist ein bidirektionales Enzym. Parallel dazu existiert die ATP-abhängige vakuoläre Protonen-pumpende ATPase (vATPase). Carystinos et al. (1995) berichteten, dass die Expression, Proteinmenge und Aktivität der vPPase unter hypoxischen Bedingungen erhöht sind. Mit Sauerstoffmangel behandelte Reiskeimlinge zeigten nach 2 Tagen im Dunkeln ein 75-fache Induktion der spezifischen vPPase-Aktivität, wohingegen die vATPase-Aktivität nur leicht um das 2-fache erhöht war (Carystinos et al., 1995).

Mustroph et al. (2005) stellten transgene Kartoffelpflanzen her, welche die *E. coli* Pyrophosphatase überexprimierten. Die transformierten Kartoffelpflanzen wiesen einen reduzierten cytosolischen PPi-Gehalt auf und akkumulierten im Vergleich zum Wildtyp in Wurzeln bei Hypoxie verstärkt Saccharose. Zudem zeigten die transgenen Pflanzen nach viertägiger hypoxischer Behandlung und anschließender viertägiger normoxischer Regenerationsphase im Vergleich zur nicht behandelten Kontrolle und zum behandelten Wildtyp ein deutlich geringeres Wurzel- und Sprosswachstum (Mustroph et al., 2005).

Die Pyruvat-Phosphate-Dikinase (PPDK) ist ein weiteres PPi-abhängiges Enzym und metabolisiert folgende reversible Reaktion (Abbildung 1, Gleichung (1)):



In C_4 -Pflanzen versorgt die PPDK die CO_2 -Fixierung mit dem CO_2 -Akzeptor Phosphoenolpyruvat (PEP), in C_3 -Pflanzen ist ihre Funktion noch unklar. In anoxisch behandelten Koleoptilen von Reis konnten Lasanthi-Kudahettige et al. (2007) zeigen, dass die Genexpression einer der zwei cytosolischen *PPDKs* 365-fach induziert war. Mit einer 594-fachen Induktion war die *PDC* in diesem Microarray das am stärksten induzierte Gen, während die *PPDK* am zweitstärksten induziert war (Lasanthi-Kudahettige et al., 2007). Zusätzlich konnten in *Oryza sativa* unter hypoxischen Bedingungen erhöhte PPDK-Proteingehalte und -aktivitäten beobachtet werden (Moons et al., 1998; Huang et al., 2005).

Die Phosphorylierung von Fructose-6-Phosphat (Fru6P) zu Fructose-1,6-Bisphosphat (Fru1,6BP) ist ebenfalls ein Prozess, bei dem parallel ATP oder PPi als Phosphatdonor Verwendung finden. Während die PFP PPi als Phosphatdonor verwendet, kann die PFK zur

Phosphorylierung von Fru6P ATP in Gebrauch nehmen (Abbildung 1). Es wurde bereits berichtet, dass die PFP-Expression in 4 Tage alten Koleoptilen (Lasanthi-Kudahettige et al., 2007) oder drei Wochen alten Reispflanzen (Mustroph et al., 2013) bei Sauerstoffmangel induziert ist.

1.4.3 Die potentielle Bedeutung der PPi-abhängigen Enzyme bei Reis

Reis ist als Kulturpflanze und als Grundnahrungsmittel für Millionen von Menschen von sehr hoher Bedeutung. Während der Monsunzeit werden in Asien jedes Jahr große Landflächen überflutet. Mit ihren geringen Ernteerträgen können diese überfluteten Landflächen damit zum steigenden Nahrungsmittelbedarf dieser Region nur wenig beitragen (Weather and Rice: Proceedings of the International Workshop on The Impact of Weather Parameters on Growth and Yield of Rice, 1987). Spezielle Anpassungsmechanismen können jedoch bei Reispflanzen potentiell die Toleranz gegenüber Überflutung steigern. So berichteten Mustroph et al. (2014), dass in Reis unter hypoxischen Bedingungen die Transkriptmenge der vier PPi-anhängigen Enzyme SuSy, PFP, vPPase und PPDK erhöht ist. Unter Einsatz der alternativen PPi-abhängigen Enzyme SuSy und PFP werden für den Abbau von Saccharose lediglich drei PPi verbraucht, die durch biosynthetische Prozesse recycelt werden können. Dagegen kostet die Metabolisierung eines Moleküls Saccharose über die Invertase und PFK zusätzlich vier Moleküle ATP. Potentiell verdoppelt sich bei Sauerstoffmangel durch die Verwendung der alternativen PPi-abhängigen Enzyme die ATP-Ausbeute der Glycolyse (Stitt, 1998).

1.5 Charakterisierung der PFK und PFP

In Gegensatz zu Tieren besitzen Pflanzen zwei verschieden Enzyme zur Phosphorylierung von Fru6P, die PFK und PFP. Die PFK metabolisiert irreversibel die Phosphorylierung von Fru6P zu Fru1,6BP. Dabei verwendet das Enzym ATP als Phosphatdonor. Daneben existiert das alternative Enzym PFP, das für dieselbe Reaktion PPi als Phosphatdonor benutzt. Eine wichtige Eigenschaft dieses Enzyms ist, dass es diese Reaktion reversibel durchführt und damit sowohl die PFK als auch die Fructose-1,6-Bisphosphatase (FBPase) ersetzen kann (Abbildung 1).

1.5.1 Die Rolle der PFP

Seit ihrer Entdeckung 1979 (Carnal und Black, 1979) wurde die PFP ausführlich auf biochemischer und molekularer Ebene in Spezies wie *Arabidopsis thaliana* (Lim et al., 2007,

2014), *Oryza sativa* (Mertens et al., 1990; Mustroph et al., 2013), *Saccharum officinarum* (Groenewald und Botha, 2008; van der Merwe et al., 2010), *Nicotiana tabacum* (Nielsen und Stitt, 2001), *Solanum tuberosum* (Stitt, 1989; Mustroph et al., 2005), *Citrullus lanatus* (Botha, 1991; Botha und Botha, 1993), *Triticum aestivum* (Mahajan und Singh, 1989, 1990; Trevanion, 2000) und *Ricinus communis* (Kombrink und Kruger, 1984; Blakeley et al., 1992; Podestá und Plaxton, 1994) charakterisiert. Obwohl die PFP hauptsächlich für das Pflanzenreich spezifisch ist, konnten PFPs zusätzlich in einigen Mikroorganismen wie *Propionibacterium shermanii* (O'Brien et al., 1975), *Entamoeba histolytica* (Deng et al., 1998) und *Amycolatopsis methanolica* (Alves et al., 1996) identifiziert werden.

Bislang konnte gezeigt werden, dass die PFP aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten besteht. Generell bildet die regulatorisch aktive α -Untereinheit mit der katalytisch aktiven β -Untereinheit ein Heterotetramer (Yan und Tao, 1984; Kruger und Dennis, 1987; Wong et al., 1990; Todd et al., 1995; Theodorou und Plaxton, 1996). In Tieren wird die PFK durch Fru2,6BP aktiviert, wohingegen in Pflanzen diese Eigenschaft auf die PFP transferiert wurde (Michels und Rigden, 2006) und die pflanzlichen PFKs insensitiv gegenüber Fru2,6BP geworden sind (Stitt, 1990). Fru2,6BP kann die PFP sowohl in Richtung der Gluconeogenese als auch der Glycolyse aktivieren. Dabei erhöht Fru2,6BP die Affinität der PFP für ihre Substrate Fru6P und Fru1,6BP (Stitt und Vasella, 1988). Daneben wurde in zahlreichen Studien gezeigt, dass die Reaktion in Richtung der Gluconeogenese durch PPI stark inhibiert wird, indem PPI kompetitiv zu Fru2,6BP agiert. Zudem ist Phosphat ein nicht kompetitiver Inhibitor der glycolytischen Reaktion und stellt damit einen starken Antagonisten zu Fru2,6BP dar (Stitt, 1989; Theodorou und Plaxton, 1996). Unter hypoxischen Bedingungen konnte in *Oryza sativa* Keimlingen, *Daucus carota* sowie *Euglena gracilis* eine Akkumulation von Fru2,6BP beobachtet werden (Enomoto et al., 1990; Mertens et al., 1990; Kato-Noguchi und Watada, 1996).

Neben dem komplexen Regulationsnetzwerk erschwert eine zusätzliche Eigenschaft die Feststellung der Bedeutung des Enzyms für die Pflanze. Wie Weiner et al. (1987) zeigten, läuft die reversible Reaktion in der Zelle nahe am Gleichgewicht ab. Die Äußerungen innerhalb der Literatur sind in diesem Zusammenhang widersprüchlich. So wurde in Pflanzen wie *Oryza sativa*, *Solanum tuberosum* und *Saccharum spp.* (Rohrzucker) über eine vorwiegend glycolytische Funktion der PFP berichtet (Mertens, 1991; Hajirezaei et al., 1994; Paul et al., 1995; van der Merwe et al., 2010). Hajirezaei et al. (1994) beschrieben, dass eine starke Reduktion der PFP-Aktivität in Kartoffeln zu einer leichten Akkumulation von Hexosen und einer gleichzeitigen Reduktion von PEP und 3-Phosphoglycerat (3-PGA) führte. Andererseits wurde in Pflanzen wie *Citrullus lanatus* (Botha und Botha, 1993) und *Musa cavendishii* (Ball et al., 1991; Hill und Rees, 1995) eine Funktion in Richtung der Gluconeogenese beschrieben. Dabei konnte in reifenden Bananen (*Musa cavendishii*) bei 10 % Sauerstoff eine erhöhte

Recyclingrate von Triosephosphaten (TrioseP) zu Hexosephosphaten beobachtet werden (Hill und Rees, 1995). Da jedoch bereits bekannt ist, dass die Frucht der Bananen keine cytosolische Fructose-1,6-Bisphosphatase (cFBPase) besitzt (Ball et al., 1991), folgerten Hill und Rees (1995), dass die erhöhte Recyclingrate durch die PFP katalysiert werden muss. Zunehmend wird die PFP von Autoren als ein flexibles Enzym interpretiert, dass je nach Stress und entwicklungsspezifischem Stadium sowie Gewebeart die Richtung der Reaktion an den veränderten Zustand des Stoffwechsel in der Zelle anpassen kann (Hajirezaei et al., 1994; Costa dos Santos et al., 2003; Huang et al., 2008; Atwell et al., 2015).

Das *Arabidopsis thaliana*-Genom kodiert für je zwei α - und β -Untereinheiten. Das Reisgenom kodiert nur für eine β -Untereinheit und für vier α -Untereinheiten (Nielsen et al., 2004; Lim et al., 2007, 2009; Mustroph et al., 2013). Während die Expression der SuSy speziesübergreifend in hypoxischen Geweben erhöht ist, wird die PFP-Genexpression in Reis, jedoch nicht in *Arabidopsis thaliana* induziert (Lasanthi-Kudahettige et al., 2007; Mustroph et al., 2013, 2014). Allerdings geben Expressionsanalysen und die biochemische Charakterisierung der PFP nur eine unvollständige Übersicht über die Bedeutung dieses Enzyms für den Metabolismus der Pflanzen. Durch den Einsatz von T-DNA-Insertionsmutanten kann die funktionelle Signifikanz sowohl unter Standardbedingungen als auch bei Stressbehandlung analysiert werden. So konnten Lim et al. (2009, 2014) sowohl allgemeine Wachstumsdefekte von *Arabidopsis thaliana* PFP T-DNA-Insertionsmutanten unter Kontrollbedingungen als auch verringertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp unter salinem und osmotischem Stress beobachten. Die Funktion der PFP bei Sauerstoffmangel bleibt bislang unklar.

1.5.2 Die Rolle der PFKs

Während sich der wissenschaftliche Fokus in den letzten Jahrzehnten auf die PFP gerichtet hat und diese dementsprechend im Detail in zahlreichen Spezies biochemisch und molekularbiologisch charakterisiert wurden, erhielten die pflanzlichen PFKs im Gegensatz dazu nur wenig Aufmerksamkeit. In Tieren bereits ausführlich untersucht, wurde die Nukleotidsequenz und die Zusammensetzung der Aminosäuren in *Arabidopsis thaliana* erst 2007 beschrieben (Mustroph et al., 2007; Winkler et al., 2007). Bislang wurden die pflanzlichen PFKs nur in *Musa cavendishii* (Bananen) ausführlicher analysiert (Salminen und Young, 1975; Nair, 1981; Surendranathan et al., 1990; Surendranathan, 1992). Während geklärt ist, dass die PFP mit wenigen Ausnahmen einen Heterotetramer aus den zwei verschiedenen α - und β -Untereinheiten formt, (Yan und Tao, 1984; Kruger und Dennis, 1987; Botha, 1991; Nielsen, 1994), ist die Zusammensetzung der pflanzlichen PFKs noch nicht detailliert aufgeklärt. Die Charakterisierung der PFKs wird durch ihre starke Instabilität bei der Aufreinigung erschwert

und verhindert somit oft die weitere Aufklärung der Untereinheitenkomposition (Isaac und Rhodes, 1982; Turner und Plaxton, 2003). So konnte Turner und Plaxton (2003) aus Bananen zwei PFKs mit den molekularen Massen von 210 und 160 Kilodalton (kDa) isolieren, darüber hinaus konnten über die Untereinheitenkomposition keine weiteren Aussagen getroffen werden. Kruger et al. (1988) konnten in *Solanum tuberosum* vier verschiedene PFK-Isoformen identifizieren, die sich aus vier verschiedenen Untereinheiten zusammensetzen. Das Molekulargewicht der Untereinheiten variierte zwischen 46 und 53 kDa (Kruger et al., 1988). Im Gegensatz dazu konnte aus Spinatblättern ein Homotetramer, bestehend aus einer 52 kDa großen Untereinheit, isoliert werden (Winkler et al., 2007). Obwohl schon zahlreiche PFK-Proteinstrukturen aufgeklärt wurden, unter anderem in *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Paricharttanakul et al., 2005; Mosser et al., 2012; Newman et al., 2012), in dem eukaryotischen Mikroorganismus *Trypanosoma brucei brucei* (McNae et al., 2009) sowie im europäischen Hasen (*Oryctolagus cuniculus*) und im Menschen (Banaszak et al., 2011; Kloos et al., 2014), konnte bis jetzt keine pflanzliche PFK kristallisiert werden. Die bisher publizierten Arbeiten zeigen jedoch, dass die pflanzlichen PFK in Größe und Zusammensetzung eine deutlich höhere Diversität als die PFP aufweist.

Bislang konnten zahlreiche Stoffe des Kohlenhydratmetabolismus als auch Ionen identifiziert werden, die Einfluss auf die Aktivität des Enzyms haben. Die Aktivität der plastidär sowie der cytosolisch lokalisierten PFK wird durch C3-Verbindungen inhibiert. So konnten für die plastidische PFK Phosphatidylglycerol (PG), PEP und 3-PGA (Knowles et al., 1990) als Inhibitoren identifiziert werden, während die Aktivität der im Cytosol lokalisierten PFK durch PEP reduziert wird (Häusler et al., 1989). Kelly und Latzko (1977a) haben aus Spinatblättern zwei verschiedene PFKs isoliert. Die im Plastiden lokalisierte PFK wurde dabei stark von Phosphat (Pi) inhibiert, wohingegen Pi die im Cytosol lokalisierte PFK stark aktiviert (Kelly und Latzko, 1977a). Im Unterschied dazu konnten Wong et al. (1987) aus Karottenwurzeln die cytosolische PFK isolieren und berichteten, dass die Regulation durch Pi vom pH abhängig war. Die drei isolierten Isoformen wurden bei hohen pH-Werten inhibiert und mit graduell sinkendem pH-Wert aktiviert (Wong et al., 1987). Zusätzlich dazu wird die plastidische PFK durch steigende Konzentrationen ihres Substrats, des Fru6P, aktiviert und durch hohe Mengen ATP inhibiert (Kelly und Latzko, 1977b). Neben der scheinbar hohen Diversität bei der Proteinzusammensetzung spiegelt sich die enorme Plastizität dieses Enzyms auch in seiner vielfältigen, bislang unzureichend aufgeklärten Regulation wieder, wobei hier anscheinend zwischen cytosolisch und plastidär lokalisierten PFKs unterschieden werden muss.

Das *Arabidopsis thaliana*-Genom kodiert für sieben Isoformen der PFK. Zwei davon sind im Chloroplasten und die restlichen fünf im Cytosol lokalisiert (Mustroph et al., 2007). Zuletzt

konnten Mustroph et al. (2013) die PFP- und PFK-Genfamilie in Reis bei Sauerstoffmangel charakterisieren. Unter Verwendung einer *Blast*-Analyse konnten 15 Sequenzen aus dem Reisgenom identifiziert werden, die starke Ähnlichkeit mit den *Arabidopsis thaliana* PFKs aufwiesen. Eine phylogenetische Analyse ergab, dass vier der aus Reis stammenden Sequenzen für die PFP α -Untereinheit kodierten, während eine Sequenz mit den zwei *Arabidopsis thaliana* PFP β -Untereinheiten gruppierte. Die restlichen 10 Sequenzen kodierten für verschiedene PFKs. Dabei sind sieben der 10 *Oryza sativa* PFKs im Cytosol lokalisiert. Die restlichen drei PFKs konnten in Chloroplasten lokalisiert werden. Weiterhin gliederten sich die PFKs aus Reis und *Arabidopsis thaliana* in drei verschiedene Gruppen (Abbildung 2) und waren bei Anoxie differentiell reguliert (Mustroph et al., 2013).

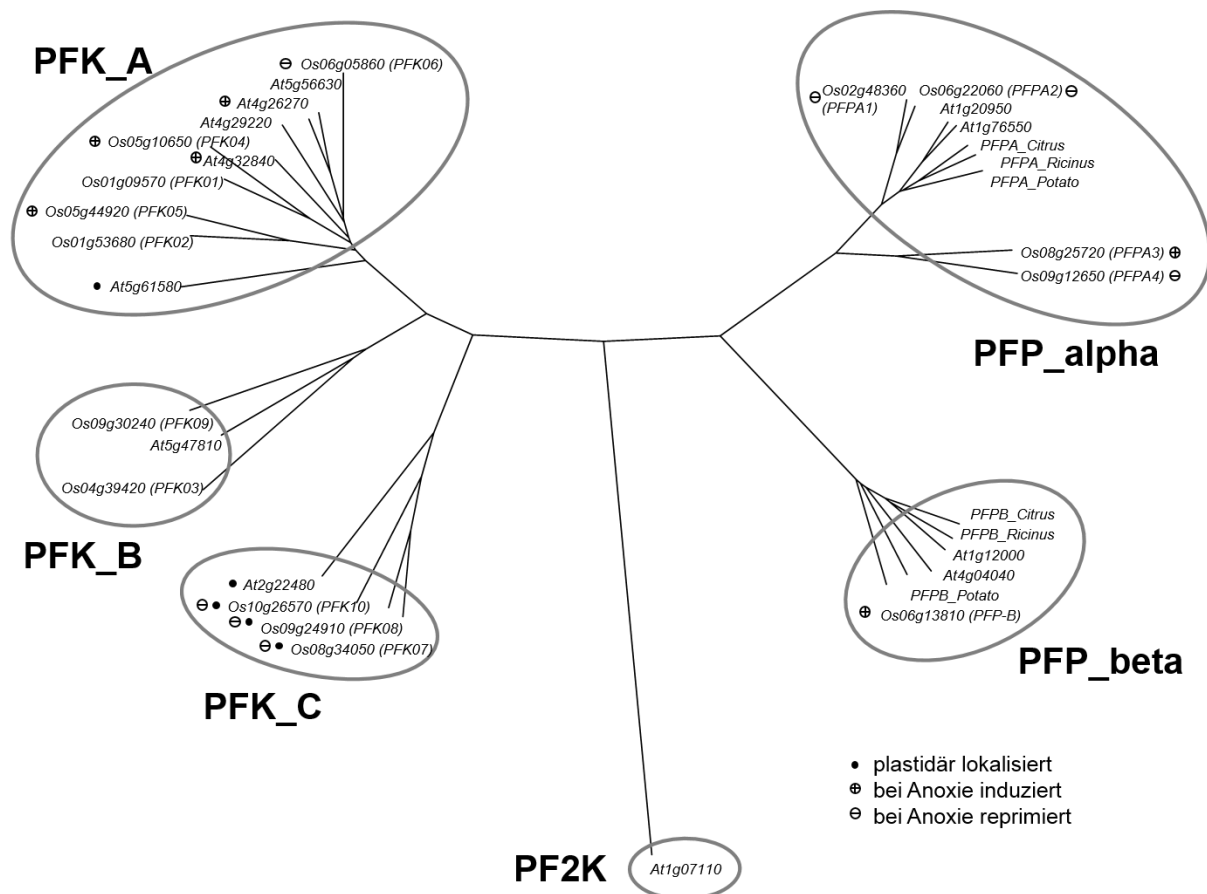


Abbildung 2: Phylogenetischer Stammbaum pflanzlicher PFKs und PFPs (Mustroph et al., 2013).

Dargestellt sind die PFPs und PFKs aus den Pflanzen *Arabidopsis thaliana* (Präfix: At), *Oryza sativa* (Präfix: Os). Gene, die mit einem „plus“ markiert sind, zeigen bei Anoxie ein erhöhtes Transkriptlevel. Die Gene, die mit einem „minus“ markiert sind, weisen ein reduziertes Transkriptlevel auf. Als Außengruppe wurde die PF2K (At1g07110) verwendet. Der nicht gewurzelte Stammbaum wurde mit der *neighbor joining*-Methode unter Verwendung der PFK-, PFP- und PF2K-Aminosäuresequenzen mit CLUSTALW erstellt. Zusätzliche PFPs anderer Pflanzen (mit Akzessionsnummer): Citrus_Alpha, AAC67587; Potato_Alpha, P21342; Ricinus_Alpha, Q41140; Citrus_Beta, AAC67586; Potato_Beta, P21343; Ricinus_Beta, Q41141.

1.6 Die Funktion der PF2K und das regulatorische Molekül Fru2,6BP

Bereits gezeigt wurde, dass *Oryza sativa* (Mertens et al., 1990), *Daucus carota* (Kato-Noguchi und Watada, 1996) und *Euglena gracilis* (Enomoto et al., 1990) unter hypoxischen Bedingungen Fru2,6BP akkumulieren. Wie zuvor erwähnt, ist Fru2,6BP ein potenter Aktivator der PFP. Darüber hinaus ist es auch in der Lage, die cFBPase zu inhibieren (Stitt, 1990). Der cytosolische Fru2,6BP-Gehalt schwankt zwischen 30 pmol/g Frischgewicht (FW) in Blättern von *Nicotiana tabacum* und 300 pmol/g FW im Endosperm von *Ricinus communis* Keimlingen (Kruger und Beevers, 1985; Hajirezaei und Stitt, 1991; Kruger und Scott, 1995). Unter

optimalen Bedingungen wird die PFP durch Fru2,6BP im nanomolaren Bereich aktiviert, jedoch konnten Theodorou und Kruger (2001) zeigen, dass sich unter physiologischen Bedingungen die Affinität des Enzyms zum Fru2,6BP verringert (Nielsen, 1994; Theodorou und Kruger, 2001) und somit eine höhere Menge an Fru2,6BP nötig wird, um die PFP zu aktivieren.

Im Gegensatz zu Tieren ist die *PF2K*-Expression unter hypoxischen Bedingungen in *Arabidopsis thaliana* nicht induziert, unterliegt in der Pflanze jedoch einer strengen Regulation (Mustroph et al., 2010, 2014). Gezeigt wurde bereits, dass das regulatorische 14-3-3 Protein in der Lage ist, an die PF2K zu binden (Kulma et al., 2004; Harthill et al., 2006). Dabei phosphoryliert es zwei Serine (Ser220 und Ser303) am N-terminalen Ende des Proteins. Daneben konnte eine Vielzahl von Metaboliten des Stoffwechsels identifiziert werden, die einen Einfluss auf die Aktivität des Proteins haben. Mitte der 80er Jahre konnte die PF2K aus Spinat isoliert und aufgereinigt werden (Larondelle et al., 1986). Anhand dieser PF2K wurde Phosphat als ein Aktivator identifiziert, der die Affinität des Proteins zu Fru6P und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erhöht. Zusätzlich dazu wird die PF2K durch ihr eigenes Substrat, das Fru6P, aktiviert (Cséke und Buchanan, 1983). Im Gegensatz dazu wurden einige C3-Verbindungen identifiziert, die in der Lage sind, die PF2K-Aktivität zu inhibieren. Die C3-Verbindungen PEP, 3-PGA, 2-PGA und Dihydroxyacetonphosphat konnten die PF2K-Aktivität antagonistisch zur Wirkung von Phosphat inhibieren (Cséke und Buchanan, 1983; Stitt et al., 1984; Larondelle et al., 1986; Stitt, 1990). Durch simultane Aktivierung der PFP und zusätzliche Inhibition der FBPase stellt Fru2,6PB ein potentiell wichtiges, regulatorisches Molekül des Kohlenhydratmetabolismus dar.

Neben der extensiven Aufklärung der biochemischen Eigenschaften wurden zunehmend physiologisch-molekularbiologische Studien publiziert. So zeigten PF2K Antisense-Mutanten von *Arabidopsis thaliana* ein verringertes PF2K-Transkriptlevel und geringere Fru2,6BP-Mengen. Diurnal-abhängig verursachte die Mutation im Vergleich zum Wildtyp Unterschiede im Saccharose-, Glucose-, und Fructosegehalt (Draborg et al., 2001). Erst kürzlich berichteten McCormick und Kruger (2015), dass PF2K T-DNA-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp unter fluktuierenden Licht- und Temperaturbedingungen eine verringerte Wachstumsrate und Samenausbeute aufwiesen, wohingegen unter optimalen Bedingungen keine Unterschiede zwischen Mutante und Wildtyp beobachtet werden konnten. Die Autoren schlussfolgerten, dass Fru2,6BP für die Optimierung der Regulation des photosynthetischen Kohlenhydratmetabolismus unter schwankenden Wachstumsbedingungen notwendig sei (McCormick und Kruger, 2015).

1.7 Zielsetzung

Viele Vorgänge sind vor allem in der Pflanze bei Sauerstoffmangel und Überflutung noch unzureichend verstanden. Während die Sauerstoffsensoren HIF1 in Tieren und FNR in Bakterien wie *E. coli* bereits seit über 20 Jahren bekannt sind und bis heute gut beschrieben wurden (Lambden und Guest, 1976; Spiro und Guest, 1990; Semenza und Wang, 1992; Costa dos Santos et al., 2003; Crack et al., 2004; Lahiri et al., 2006; Taabazuing et al., 2014), konnte erst kürzlich der Transkriptionsfaktor und Sensor für die Perzeption von Sauerstoff in Pflanzen identifiziert werden (Licausi et al., 2011; Gibbs et al., 2011). Obwohl die PFP schon in verschiedenen Spezies biochemisch ausgezeichnet charakterisiert wurde, ist über die physiologische Relevanz dieses Enzyms bei Sauerstoffmangel und Überflutung noch wenig bekannt.

Reis ist eine gegenüber Sauerstoffmangel tolerante Spezies und variiert im Vergleich zur intoleranten Spezies *Arabidopsis thaliana* sehr stark in seinen transkriptionellen und physiologischen Anpassungsmechanismen. So ist bei Hypoxie die Expression der PPI-nutzenden Enzyme wie SuSy, PPDK, PFP und vPPase im Vergleich zu *Arabidopsis thaliana* besonders stark induziert.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten die folgenden Fragen beantwortet werden:

- Arbeitet die PFP in Richtung der Glycolyse oder versorgt sie die pflanzliche Zelle bei Sauerstoffmangel mit den alternativen Energiedonor PPI?
- Welchen Einfluss hat die PFP aus Reis auf die Überflutungstoleranz von *Oryza sativa*?
- Trägt die PFP aus *Arabidopsis thaliana* zur Überflutungstoleranz der Pflanze bei?
- Verursacht die Deletion der PFP einen Unterschied bei der Überflutungstoleranz zwischen den beiden Spezies *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa*?

Um diese Fragen zu beantworten, sind Untersuchungen an transgenen Pflanzen mit erhöhter oder verringerter PFP-Aktivität notwendig. Zu diesem Zweck wurden PFP T-DNA-

Insertionsmutanten von *Arabidopsis thaliana* selektiert, die PFP/PFK-Aktivität bestimmt sowie die Metabolitverteilung und die Überlebensrate bei Überflutung nachgewiesen. Anschließend wurden Doppelmutanten der beiden α - und β -Untereinheiten hergestellt und anfängliche Untersuchungen durchgeführt. Zudem wurden OsPFP β RNA *interference* (RNAi)-Linien hergestellt und im Kallusgewebe sowie in den regenerierten Pflanzen die PFP-Aktivität analysiert und die Gehalte der Zucker des primären Stoffwechsels bestimmt.

Arabidopsis thaliana kodiert für sieben verschiedene Isoformen der PFKs, von denen zwei bei Hypoxie induziert werden und zwei in Chloroplasten lokalisiert sind. Viele plastidär lokalisierte Enzyme sind lichtabhängig Redox-reguliert. Zudem wurde in einigen Studien in den späten 70ern und frühen 80ern gezeigt, dass Chloroplasten, die mit Licht behandelt wurden, eine erniedrigte PFK-Aktivität aufwiesen.

In diesem Zusammenhang wurden folgende Fragen gestellt:

- Spielen die PFKs bei Hypoxie für den pflanzlichen Metabolismus eine entscheidende Rolle?
- Welche der in Chloroplasten lokalisierten PFK aus *Arabidopsis thaliana* unterliegt einer lichtabhängigen Regulation?
- Was sind die Eigenschaften dieser Regulation und welche Aminosäuren sind daran beteiligt?

Um diese Fragen zu adressieren, wurden T-DNA-Insertionslinien der *Arabidopsis thaliana* PFK1, 2, 3, 4, 6 und 7 identifiziert und sowie PFK5 RNAi-Linien hergestellt und anschließend die PFP/PFK-Aktivität unter Sauerstoffmangel ermittelt. Um die potentielle Redox-Regulation der plastidär lokalisierten PFKs zu untersuchen, wurden Chloroplasten-Extrakte mit Licht behandelt und die PFK-Aktivität ermittelt. Des Weiteren wurden konservierte Cysteine mutagenisiert und die PFK-Aktivität unter reduzierenden und oxidierenden Bedingungen analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien stammten von Duchefa Biochemie (Haarlem, Niederlande), Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Grüssing GmbH Analytica (Filsum, Deutschland) und VWR (Ismaning, Deutschland), Roche (Mannheim, Deutschland).

2.1.2 Sonstige Verbrauchsmaterialien und Geräte

Für die Gelextraktion wurde das *GeneJET Gel Extraction Kit* verwendet. Zur Aufreinigung von PCR-Produkten fand das *GeneJET Gel Extraction Kit* Verwendung. Die Isolierung von Plasmiden aus bakteriellen Suspensionskulturen wurde mit dem *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* durchgeführt. Alle Kits wurden von Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Das in den Versuchen verwendete Wasser stammte aus einer Advantage Milli-Q-Anlage (Millipore, Billerica, USA). Photometrische Messungen wurden am Spektralphotometer Specord® 200 der Firma Analytik Jena (Jena, Deutschland) durchgeführt. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte mit dem Spektralphotometer NanoPhotometer® P300 der Firma IMPLEN GmbH (München, Deutschland).

2.1.3 Enzyme

Restriktionsenzyme, T4-DNA-Ligase und Enzyme, die für die *complementary* DNA (cDNA)-Synthese Verwendung fanden, wurden von Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Die Enzyme Aldolase, Triosephosphat-Isomerase und Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase wurden zur Messung der PFK/PFP-Enzymaktivität von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen. Zur Bestimmung von Metabolitgehalten wurden Laktatdehydrogenase, Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Leuconostoc mesenteroides*, Phosphoglucose-Isomerase und Invertase aus *Saccharomyces cerevisiae* von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) sowie Pyruvatkinase und Hexokinase von Roche (Mannheim, Deutschland) verwendet.

2.1.4 Oligonuklotide

Alle synthetischen Oligonukleotide wurden von Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Eine Auflistung ist den Tabellen (Tabelle 4, 5, 6) im Anhang zu entnehmen.

2.1.5 Plasmide

Tabelle 1: Dargestellt sind die verwendeten Vektoren mit entsprechenden Selektionsmarkern und ihrer Verwendung (Karimi et al., 2002; Curtis und Grossniklaus, 2003; Mustroph et al., 2007).

Vektor	Verwendung	Antibiotikum
pGEM®-T	Subklonierung	Ampicillin
pBinAR	Überexpression in <i>Nicotiana benthamiana</i>	Kanamycin
pH7GWIWG2,0	RNAi in <i>Oryza sativa</i>	Spectinomycin
pMDC7	Etablierung der Reistransformation	Kanamycin
pDONR™221	Subklonierung, Eingangsvektor	Kanamycin
pXHB7FNFI-UBIL	Etablierung der Reistransformation	Hygromycin B

2.1.6 Bakterienstämme

Für Klonierungen fand der *Escherichia coli* (*E. coli*) Stamm DH10β sowie DB3.1 (für die Gateway-Vektoren) Verwendung. Die Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurde mit dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm LBD4404 (Hoekema et al., 1983) durchgeführt. Die Infektion von Kallus zur Herstellung von transgenen *Oryza sativa* (Os) L. Subspezies (ssp.) Japonica Kultivar (cv.) Nipponbare RNAi Linien erfolgte mit *Agrobacterium tumefaciens* EHA105-Zellen (Hood et al., 1993).

2.1.7 Pflanzenmaterial

Wildtyp-Samen von *Arabidopsis thaliana* (L.), Ökotyp Columbia wurden von Julia Bailey-Serres (University of California, Riverside, USA) bezogen. Samen der T-DNA-Insertionslinien (Tabelle 2) von *Arabidopsis thaliana* (L.), Ökotyp Columbia stammen vom *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC) (Scholl et al., 2000; Alonso et al., 2003). Die T-DNA-

Insertionsmutante GK-865E04, mit einer Insertion im Lokus At1g76550 (*AtPFP α 2*-Gen), stammte von GABI-KAT (Max-Planck-Institut, Köln, Deutschland). Samen zur Transformation von *Oryza sativa* L. ssp. Japonica cv. Nipponbare wurden von Takeshi Fukao (University of California, Riverside, USA) bezogen. Die Infiltrationsexperimente wurden mit *Nicotiana benthamiana* (Wildtyp) durchgeführt. Für die funktionelle Analyse des *OsPFP β* -Gens wurde die T-DNA-Insertionsmutante PFG_2D-31392.R im *Oryza sativa* L. ssp. Japonica cv. Hwayoung Hintergrund verwendet (Jeong et al., 2006).

Tabelle 2: Verwendete T-DNA-Insertionslinien mit Angaben zum Gen, zum Lokus, zu dem in dieser Arbeit verwendeten Arbeitstitel und zur Bezeichnung der Linie.

Gen	Lokus	Arbeitstitel	Bezeichnung der Linie
<i>AtPFPα1</i>	At1g20950	<i>pfpα1-1</i>	Salk_056908C
<i>AtPFPα1</i>	At1g20950	<i>pfpα1-2</i>	Salk_128975C
<i>AtPFPα2</i>	At1g76550	<i>pfpα2-1</i>	GK-865E04
<i>AtPFPβ1</i>	At1g12000	<i>pfpβ1-1</i>	Salk_111562
<i>AtPFPβ2</i>	At4g04040	<i>pfpβ2-1</i>	Salk_025504
<i>AtPFPβ2</i>	At4g04040	<i>pfpβ2-2</i>	Salk_008847
<i>AtPFK1</i>	At4g29220	<i>pfk1</i>	Salk_011913
<i>AtPFK2</i>	At5g47810	<i>pfk2</i>	Salk_088087
<i>AtPFK3</i>	At4g26270	<i>pfk3</i>	Salk_125458
<i>AtPFK4</i>	At5g61580	<i>pfk4</i>	Salk_026549
<i>AtPFK6</i>	At4g32840	<i>pfk6</i>	Salk_048795
<i>AtPFK7</i>	At5g56630	<i>pfk7</i>	Salk_147551
<i>AtPF2K</i>	At1g07110	<i>pf2k_1</i>	Salk_036916
<i>AtPF2K</i>	At1g07110	<i>pf2k_2</i>	Salk_016314
<i>OsPFPβ</i>	Os06g13810	<i>OsPFPβ</i>	PFG_2D-31392.R

2.2 Pflanzenanzucht

2.2.1 Zusammensetzung der Erde für die Pflanzenanzucht

Bei der Anzucht von *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana benthamiana* auf Erde fand ein Gemisch aus Einheitspflanzenerde Typ GS90 grob® vom Einheitserde Werkverband (Sinntal-Jossa, Deutschland), Pikiererde der Firma Ökohum GmbH (Herbertingen,

Deutschland) und Vermiculit von der Deutsche Vermiculite Dämmstoff GmbH (Sprockhövel, Deutschland) in einem Verhältnis von 3:3:1 Verwendung. Das Erdgemisch wurde in dem Erddämpfgerät Sterilo 1 K der Firma H. Nitsch & Sohn GmbH & Co. KG (Kreuztal, Deutschland) bei 80 °C für zwei Stunden pasteurisiert.

2.2.2 Anzucht von *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana benthamiana* unter Standardbedingungen

Nicotiana benthamiana Samen wurden auf das Erdgemisch ausgesät und vier bis sechs Wochen unter Langtagbedingungen mit einem Tag-/Nachtrhythmus von 16 Stunden Licht ($70 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bei 24 °C angezogen.

Zur Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurden ca. 15 Samen in einen Topf ausgesät und für 48 Stunden bei 4 °C im Dunkeln stratifiziert. Anschließend wurden die Pflanzen unter Langtagbedingungen mit einem Tag-/Nachtrhythmus von 16 Stunden Licht ($70 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bei 24 °C bis zur Blütereife angezogen.

Zur Herstellung von Kreuzungen wurden Pflanzen zuerst 7 Tage unter sterilen Bedingungen angezogen (2.2.3) und anschließend auf das Erdgemisch (2.2.1) transferiert. Um eine gleichmäßige Blühinduktion zu gewährleisten, wurden die auf Erde übertragenen Pflanzen zuerst für vier Wochen unter Kurztagbedingungen mit einem Tag-/Nachtrhythmus von 8 Stunden Licht ($85 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bei 23 °C angezogen und anschließend in den Langtag mit einem Tag-/Nachtrhythmus von 16 Stunden Licht ($70 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und 24 °C transferiert.

2.2.3 Anzucht von *Arabidopsis thaliana* unter sterilen Bedingungen

Für Sterilversuche wurden die Samen zuerst oberflächlich sterilisiert. Hierfür wurden ca. 50 mg Samen in 2 ml Reaktionsgefäße abgefüllt und in einem 10 l Exsikkator geöffnet platziert. Durch ein Gemisch aus 10 ml Natriumhypochloritlösung (12 % Cl) und 5 ml 37 %iger Salzsäure wurde im geschlossenen Exsikkator Chlorgas freigesetzt. Nach einer Sterilisationszeit von 45 Minuten wurde das Chlorgas für eine Stunde abgesaugt, die Samen unter einer Sterilbank entnommen und für 15 Minuten zum Ausdampfen inkubiert. Anschließend wurden die Samen auf 1-fachem Murashige und Skoog (MS) Medium (Murashige und Skoog, 1962) (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande) mit 1 % [w/v] Saccharose und 1 % [w/v] Plant Agar (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande) ausgelegt. Die Petrischalen wurden mit

*Micropore*TM-Klebeband (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande) verschlossen und für 48 Stunden bei 4 °C im Dunkeln stratifiziert. Die Anzucht auf MS-Medium erfolgte für 7 Tage in einem Pflanzenwachstumsschrank unter Langtagbedingungen bei 23 °C mit einem Tag-/Nachtrhythmus von 16 Stunden Licht ($130 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Die steril angezogenen Pflanzen wurden für Sauerstoffmangelexperimente verwendet oder zur Herstellung von Kreuzungen auf das Erdgemisch (2.2.1) transferiert.

2.2.4 Anzucht von *Oryza sativa*

Für die Anzucht von *Oryza sativa*-Reispflanzen wurden die entspelzten Karyopsen auf feuchtem Filterpapier in dünnwandigen Plastikgefäßen bei Raumtemperatur im Dunkeln für fünf Tage vorgekeimt. Danach wurden die Sämlinge in das Erdgemisch (2.2.1) eingetopft. Zuerst erfolgte die Anzucht bei 24 °C unter Langtagbedingungen mit einem Tag-/Nachtrhythmus von 16 Stunden Licht ($110 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Zur Blühinduktion wurden die Reispflanzen in den Kurztag mit 10 Stunden Licht ($330 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und 28 °C transferiert. Bewässert wurden die Reispflanzen mit Leitungswasser. Zur Düngung wurde das Leitungswasser beständig mit 0,033 % [w/v] ENTEC[®] solub 21, 0,013 % [w/v] Hakaphos Grün, 0,04 % [w/v] Hakaphos soft Novell, 0,047 % [w/v] Kalksalpeter und 0,005 % [w/v] Eisen EDTA versetzt.

2.2.5 Kultivierung von *Oryza sativa*-Kallusgewebe

Resistentes *Oryza sativa* Kallusgewebe wurde alle 14 Tage auf frische N6D-Platten mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin B transferiert und bei konstanter Lichtzufuhr ($85 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und 30 °C inkubiert. Zu Analyse von Metabolitgehalten und PFP/PFK-Aktivitäten wurde das Kallusgewebe sowie wildtypischer *Oryza sativa* ssp. Japonica cv. Nipponbare Kallus zum gleichen Zeitpunkt auf N6D-Platten ohne das Hygromycin B Selektionsantibiotikum überimpft, nach 10 Tagen Wachstum geerntet und im flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.6 Kultivierung von *Trypanosoma brucei brucei*

Die prozyklische *Trypanosoma brucei brucei* Wildtyp-Form 427 wurden in SDM-79 (Brun und Schönenberger, 1979) Standardmedium (gibco[®], life technologies, Darmstadt, Deutschland) mit 23,8 mM Natriumhydrogencarbonat, 11,5 mM Hämin (Sigma Aldrich, Steinheim,

Deutschland) sowie 10 % [v/v] *fetal bovine serum* (FCS) und einem pH von 7,3 angezogen. Die Kultivierung erfolgte in 50 ml Flaschen bei 27 °C bis zu einer Dichte von 2×10^7 Zellen. Anschließend wurden die Zellen für fünf Minuten bei $515 \times g$ und Raumtemperatur pelletiert und bei -80 °C eingefroren.

2.3 Stressbehandlung von *Arabidopsis thaliana* und Reis

2.3.1 Sauerstoffmangelversuche an *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa*

Für Sauerstoffmangelversuche wurden die *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen steril in Petrischalen für 7 Tage auf MS-Medium unter Langtagbedingungen in einem Pflanzenwachstumsschrank bei 23 °C mit einem Tag-/Nachtrhythmus von 16 Stunden Licht ($130 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) angezogen. Zuerst wurde das *Micropore*TM-Klebeband von den Platten entfernt, diese anschließend auf einer im Exsikkator verankerten Keramikplatte aufrecht stehend platziert und 6 Stunden bei kontinuierlicher Lichtzufuhr beständig mit 100 % Stickstoff begast. Das untere Viertel des Exsikkators wurde mit Wasser gefüllt und der Gasfluss zur Kontrolle darüber geleitet.

Blätter adulter *Oryza sativa*-Pflanzen wurden im Exsikkator platziert. Dabei waren in der im Exsikkator verankerten Keramikplatte Löcher integriert, durch die die Blätter der Reispflanze in das im unteren Viertel des Exsikkators befindliche Wasser platziert werden konnten. Die Blätter wurden für 24 Stunden mit einem Tag-/Nachtrhythmus von 16 Stunden Licht ($70 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bei 24 °C kontinuierlich mit 100 % Stickstoff begast.

Anschließend wurden die *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen und *Oryza sativa*-Blätter zügig geerntet und in flüssigen Stickstoff eingefroren.

2.3.2 Komplette Überflutung von *Arabidopsis thaliana*

Zu überflutende Pflanzen wurden steril für sieben Tage (2.2.3) angezogen. Ein Gemisch aus Erde (2.2.1) und Sand in einem Verhältnis von 3 zu 1 wurde in Pflanzentöpfe gefüllt. Diese wurden mit Tüllstoff überspannt, um beim späteren Tauchen der Pflanzen ein Herausdiffundieren der Erde zu verhindern. Die Pflanzen wurden von den sterilen Platten in das Erd-Sand-Gemisch transferiert und 4 Wochen unter Kurztagbedingungen mit einem Tag-/Nachtrhythmus von 8 Stunden Licht ($85 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bei 23 °C angezogen. Anschließend wurden Bottiche mit Leitungswasser gefüllt, die Pflanzen in das Wasser getaucht und für 3 oder 4 Wochen überflutet. Bei Bedarf wurde, wenn Pflanzenorgane die

Wasseroberfläche erreichten, Leitungswasser nachgefüllt. Nach der Überflutung wurden die Pflanzen für weitere 1 bis 2 Wochen zur Regeneration im Kurztag (8 Stunden Licht und $85 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und 23°C angezogen. Nach Ablauf der Regeneration wurde der Versuch photographisch dokumentiert.

2.4 Anzucht von Bakterienstämmen

2.4.1 Für Kultivierung von Bakterien verwendete Anzuchtmedien

Für Anzucht von *E. coli* in Suspensionskultur wurde Luria-Bertani (LB)-Medium verwendet. Ein Liter Flüssigmedium (pH 7) enthielt 10 g Trypton, 5 g Natriumchlorid und 5 g Hefeextrakt. Für die Anzucht von Oberflächenkulturen wurde diesem Medium 1,5 % [w/v] Agar zugesetzt.

Agrobacterium tumefaciens wurde auf YEB-Agarose-Platten und in YEB-Flüssigmedium angezogen. Ein Liter dieses Mediums (pH 7) beinhaltete 10 g Pepton, 5 g Saccharose, 1 g Hefeextrakt und 0,492 g Magnesiumsulfat. Für die Herstellung von YEB-Platten wurde diesem Medium 1,5 % [w/v] Agar zugesetzt.

2.4.2 Herstellung transformationskompetenter *Escherichia coli*

Zur Herstellung transformationskompetenter *E. coli* wurden DH10 β - und DB3.1-Zellen auf eine LB-Platte ohne Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Anschließend wurde eine Kolonie in 2 ml LB-Medium in einem sterilem Kulturröhrchen inokuliert und über Nacht bei 37°C und 220 rpm angezogen. Mit 1 ml dieser Vorkultur wurde am nächsten Tag steril eine 250 ml Hauptkultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte (OD)₆₀₀ von 0,6 bei 37°C und 220 rpm kultiviert. Die Suspension wurde 10 Minuten auf Eis inkubiert und danach in vorgekühlten Zentrifugenröhrchen 10 Minuten bei 4°C und $3220 \times g$ pelletiert, der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 10 ml gekühltem, sterilem 100 mM CaCl_2 resuspendiert. Danach wurde die Suspension 30 Minuten auf Eis inkubiert, erneut für 10 Minuten bei 4°C und $3220 \times g$ zentrifugiert, der Überstand verworfen und die pelletierten Zellen in 2 ml sterilem und gekühltem 100 mM CaCl_2 und 15 % [w/v] Glycerin resuspendiert. Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.4.3 Hitzeschock-induzierte Transformation von *Escherichia coli*

Transformationskompetente *E. coli* vom DH10 β - und DB3.1-Stamm wurden auf Eis aufgetaut. Einem Aliquot von 150 μ l wurde 0,1 bis 1 μ g zu transformierenden Plasmids zugegeben, vorsichtig gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 45 Sekunden bei 42 °C inkubiert und für weitere 2 Minuten auf Eis gelagert. Zu den Zellen wurde danach 1 ml LB-Medium gegeben, die Suspension bei 37 °C für 1 Stunde geschüttelt und auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

2.4.4 Herstellung transformationskompetenter *Agrobacterium tumefaciens*

Die Herstellung von transformationskompetenten *Agrobacterium tumefaciens* wurde modifiziert nach Höfgen und Willmitzer (1988) durchgeführt. LBD4404- und EHA105-Zellen wurden jeweils zuerst auf YEB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 28 °C kultiviert. Für beide Stämme wurde dem Medium zur Selektion 50 μ g/ml Rifampicin zugefügt, zudem wurde 150 μ g/ml Spectinomycin für den LBD4404-Stamm verwendet. Eine Einzelkolonie wurde entnommen, in 2 ml YEB-Medium mit entsprechenden Antibiotika gelöst und über Nacht bei 28 °C und 220 rpm inkubiert. 1 ml dieser Kultur wurde zum Inokulieren einer 50 ml Hauptkultur verwendet. Die Kultur wurde geschüttelt, bis sie eine OD₆₀₀ von 0,8 erreicht hatte. Anschließend wurde die Kultur bei 3220 \times g und 4 °C für 10 Minuten pelletiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in sterilem, vorgekühltem TE-Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA) resuspendiert. Die Zellen wurden erneut bei 4 °C für 10 Minuten und 3220 \times g zentrifugiert, in 4 ml sterilem TE-Puffer und 1 ml sterilem 75 % Glycerol aufgenommen. Aliquots dieser Suspension wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert.

2.4.5 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Transformationskompetente *A. tumefaciens* wurden auf Eis aufgetaut. Einem Aliquot von 100 μ l wurde 1 μ g zu transformierenden Plasmids zugegeben, vorsichtig gemischt und 5 Minuten auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Zellen für 5 Minuten in flüssigem Stickstoff inkubiert und bei 37 °C aufgetaut. Danach wurde 1 ml YEB-Medium zu den Zellen gegeben und die Suspension für 3 Stunden bei 28 °C und 550 rpm geschüttelt, auf YEB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und für 2 bis 3 Tage bei 28 °C angezogen.

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Extraktion der Phosphofructokinasen und PFPs

Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert, in ein mit flüssigem Stickstoff vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend in Extraktionspuffer (50 mM Hepes-KOH (pH 6,8), 5 mM Magnesiumacetat, 5 mM β -Mercaptoethanol, 15 % Glycerin, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA und 0,1 mM Pefabloc[®] Proteinase-Inhibitor (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)) aufgenommen. Danach wurden die Proben für 20 Minuten bei 4 °C und 16100 \times g zentrifugiert, der klare Überstand in eine neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Ermittlung der Aktivität auf Eis (2.5.3) gelagert.

2.5.2 Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976). Sie basiert auf einer kolorimetrischen Reaktion zwischen dem Protein und dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250. Zuerst wurde eine Eichreihe mit Rinder-Serum-Albumin (BSA) hergestellt. Anschließend wurden 10 μ l extrahierten Proteins (2.5.1) bzw. der Eichreihe mit 990 μ l 5-fach verdünntem Roti[®]-Quant (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) versetzt, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und zuletzt die Extinktion bei 595 nm analysiert.

2.5.3 Bestimmung der PFK- und PFP-Enzymaktivität

Für die Messung der PFK-Aktivität wurden 100 mM Hepes-KOH (pH 7,9), 2 mM $MgCl_2$, 0,15 mM NADH, 7,5 mM Fru6P und jeweils 1 *Unit* (U) Aldolase, Triosephosphat-Isomerase und Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase verwendet. Zuerst wurde die Aktivität der Blindreaktion für 5 Minuten bei 340 nm in Polystyrol Halbmikroküvetten (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) vermessen. Durch die Zugabe von 2,5 mM ATP erfolgte anschließend die Initialisierung der Enzymreaktion, diese wurde für weitere 5 Minuten bei 340 nm ermittelt. Zur Messung der PFP-Aktivität wurde der gleiche Reaktionsansatz verwendet mit der Ausnahme, dass 2,6 mM Magnesiumacetat anstatt 2 mM $MgCl_2$ verwendet wurde. Zur Aktivierung der PFP wurde 1 mM Fru2,6BP beigelegt. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 1 mM NaPPi gestartet (nach Hajirezaei et al., 1994; modifiziert von Mustroph).

2.5.4 Bestimmung der ADH-Enzymaktivität

Zur Bestimmung der ADH-Aktivität wurde Blattmaterial von *Oryza sativa* in flüssigem Stickstoff gemörst, in ein mit flüssigem Stickstoff vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend in Extraktionspuffer (50 mM Hepes-KOH (pH 6,8), 5 mM Magnesiumacetat, 5 mM β -Mercaptoethanol, 15 % Glycerin, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 mM Pefabloc® Proteinase-Inhibitor (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)) aufgenommen. 10 μ l des Proteinextraktes wurde mit 980 μ l 50 mM N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminoethansulfonsäure (TES) Puffer (pH 7,5) und 0,17 mM NADH versetzt. Zuerst wurde die Aktivität der Blindreaktion für 5 Minuten bei 340 nm in Polystyrol Halbmikroküvetten (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) vermessen. Durch Zugabe von 10 μ l 1 M Acetaldehyd erfolgte anschließend die Initialisierung der Enzymreaktion, diese wurde für weitere 5 Minuten bei 340 nm ermittelt. Die Gesamtproteinkonzentration wurde nach Bradford (2.5.2) bestimmt.

2.5.5 Oxidation und Reduktion der Extrakte unter nativen Bedingungen

Aus *Nicotiana benthamiana* isolierter Proteinextrakt (50 mM Hepes-KOH, (pH 6,8), 5 mM Magnesiumacetat, 5 mM β -Mercaptoethanol, 15 % Glycerin, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 mM Pefabloc® Proteinase-Inhibitor (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)) wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 2,5 mM Natriumtetrathionat (TT) oxidiert. Ein Aliquot von 40 μ l wurde für die umgehende Bestimmung der PFK-Aktivität (2.5.3) verwendet. Der verbliebene Extrakt wurde für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 5 mM DTT erneut reduziert. Anschließend wurde ebenfalls die Aktivität der PFK ermittelt.

2.5.6 Reduktion der Extrakte unter bedingt denaturierenden Bedingungen

Aus *Nicotiana benthamiana* isolierter Proteinextrakt (50 mM Hepes-KOH, (pH 6,8), 5 mM Magnesiumacetat, 5 mM β -Mercaptoethanol, 15 % Glycerin, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 mM Pefabloc® Proteinase-Inhibitor) wurde in einem finalen Volumen von 100 μ l mit 175 μ M Bis-Tris Propan (pH 9,0), 500 mM NaCl und 10 mM DTT für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die PFK-Aktivität (2.5.3) bestimmt.

2.5.7 Extraktion von Metaboliten

Pflanzenmaterial und Kallusgewebe wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert, 100 bis 200 mg in ein 2 ml-Reaktionsgefäß transferiert und in 1 ml 0,83 M Perchlorsäure aufgenommen. Die Proben wurden dann für 15 Minuten bei 4 °C und 16100 × g zentrifugiert, das Pellet für die Stärkeextraktion in 80 % Ethanol bei 4 °C aufbewahrt und der Überstand mit 250 µl 1 M Bicin versetzt. Anschließend wurde der Überstand mit 150 µl 4 M KOH neutralisiert, der entstandene Niederschlag wurde bei 4 °C für 15 Minuten und 16100 × g pelletiert. Der Überstand wurde bis zur Bestimmung der Zucker-, Pyruvat-, PEP- und ATP-Gehalte bei -80 °C gelagert.

Bei der Stärkeextraktion wurde das Pellet zuerst in 600 µl 80 % Ethanol resuspendiert und danach für 10 Minuten bei 16100 × g und Raumtemperatur pelletiert. Das Ethanol wurde dekantiert, das Pellet erneut in 600 µl 80 % Ethanol aufgenommen und zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit 400 µl 200 mM KOH überschichtet und homogenisiert, bei 95 °C für 1 Stunde inkubiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 9300 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 80 µl 1 N Essigsäure neutralisiert. 50 µl des neutralisierten Überstandes wurden mit 100 µl Amyloglucosidase (2 mg/ml Enzym in 50 mM Natriumacetat, pH 5 gelöst) versetzt und bei 55 °C über Nacht inkubiert. Bei dieser Reaktion wurde die Stärke in Glucose umgewandelt. Am darauffolgenden Tag wurden vor der Messung des Glucosegehaltes die Proben kurz zentrifugiert.

2.5.8 Spektrophotometrische Bestimmung von Metabolitgehalten

Alle Metabolite wurden spektrophotometrisch am Spektralphotometer Specord® 200 (Jena Analytik, Jena, Deutschland) bestimmt. Die löslichen Zucker Fructose, Glucose und Saccharose wurden in 100 mM Imidazol-Puffer (pH 6,9) mit 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 2 mM NAD und 1 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) aus *Leuconostoc mesenteroides* analysiert. Zuerst wurde für 10 Minuten die Blindmessung durchgeführt. Die Reaktion zur Bestimmung des Glucosegehaltes wurde dann mit 0,5 U Hexokinase gestartet und bei 340 nm verfolgt. Nach Eintreten des Reaktionsstillstands wurde zuerst durch Zugabe von 0,2 U Phosphoglucose-Isomerase der Fructosegehalt und anschließend durch Zugabe von 60 U Invertase der Saccharosegehalt ermittelt (Stitt et al., 1989, modifiziert von Mustroph).

Der Fru6P- und der Glucose-6-Phosphat (Glu6P)-Gehalt wurden in 100 mM Hepes-KOH (pH 7,5), 1 mM MgCl₂, 0,4 mM NAD gemessen. Zuerst wurde für 10 Minuten die Blindmessung durchgeführt, anschließend wurde die Reaktion zur Bestimmung des Glu6P-Gehaltes mit der Zugabe von 2,5 U G6PDH initialisiert und bei 340 nm bis zum Reaktionsstillstand verfolgt.

Zuletzt konnte durch die zusätzliche Zugabe von 2,5 U Phosphoglucose-Isomerase der Fru6P-Gehalt ermittelt werden.

Die Bestimmung von PEP- und Pyruvat-Gehalten erfolgte in 100 mM Hepes-KOH (pH 7,5), 2 mM MgCl_2 , 0,2 mM ADP und 0,1 mM NADH. Nach 10 Minuten initialer Blindmessung wurde durch Zugabe von 10 U Laktatdehydrogenase der Pyruvatgehalt bei 340 nm ermittelt. Nach Reaktionsstillstand erfolgte durch eine zusätzliche Zugabe von 1 U Pyruvat-Kinase die Bestimmung des PEP-Gehaltes.

Bei der Berechnung wurde die Extinktion vor dem Reaktionsstart als Blindwert von der Extinktion nach Ablauf der Reaktion subtrahiert und abschließend auf das zuvor ermittelte Probengewicht bezogen.

2.5.9 Messung der ATP-Gehalte

Am Tag vor der Messung wurde der Luciferinpuffer (25 mM Hepes-KOH (pH 7,75), 5 mM EDTA, 0,24 % [w/v] BSA, 24 mM Magnesiumacetat, 0,4 mM DTT und 0,02 % [w/v] Luciferin (Applichem, Darmstadt, Deutschland), 250 light Units/ml Luciferase (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) hergestellt und in Aluminiumfolie über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Am Tag der Messung wurde zuerst 0,07 % [w/v] Aktivkohle zum ADP-Umwandlungspuffer (6,25 mM Hepes/KOH (pH 7,75), 2,5 mM Magnesiumacetat, 0,01 % [w/v] PEP) gegeben, für 10 Minuten unter ständigem Rühren vermischt und durch Papierfilter filtriert. Anschließend wurde 140 μl Pyruvat-Kinase (Roche, Mannheim, Deutschland) in 500 μl 3,2 M Ammoniumsulfat aufgenommen und für 4 Minuten bei 4 °C und 4500 \times g zentrifugiert. Das Pellet wurde in dem filtrierten ADP-Umwandlungspuffer resuspendiert. Es wurden 14 Units Pyruvatkinase pro 1 ml ADP-Umwandlungspuffer verwendet.

Als Standard wurde 1 mM ATP bzw. 1 mM ADP jeweils in Wasser gelöst und mit NaOH neutralisiert. Diese Stammlösungen wurden jeweils auf Konzentrationen von 2 μM bis 31,25 nM ATP bzw. ADP verdünnt. Bei der ATP-Messung wurden 20 μl Extrakt, Wasser als Blindwert bzw. ATP-Standard mit 200 μl Luciferinpuffer in glasklaren Röhrchen mit Rundboden aus Polystyrol pipettiert, durch leichtes Schwenken vermischt und anschließend im Luminometer Lumac Biocounter M2010 (Lumac Systems Inc, Titusville, FL, USA) vermessen. Für die ADP-Messung wurde zuerst 20 μl Wasser als Blindwert, Extrakt bzw. der ADP-Standard mit 100 μl ADP-Umwandlungspuffer in die Röhrchen mit Rundboden aus Polystyrol pipettiert, vorsichtig gemischt und 10 Minuten inkubiert. Hierbei wurde sämtliches in der Probe befindliche ADP in ATP umgewandelt. Nachfolgend wurde, wie zuvor beschrieben, der ATP-

Gesamtgehalt der Probe ermittelt. 100 µl Luciferinpuffer wurden zu der Probe gegeben und die Intensität der Biolumineszenz am Luminometer vermessen. Abschließend wurden höhere ATP- und ADP-Konzentrationen von 0,1 mM bis 1 mM bei 260 nm spektralphotometrisch am Spektralphotometer Specord® 200 (Jena Analytik, Jena, Deutschland) analysiert. Bei der Berechnung wurde der nach der ADP-Umwandlung gemessene ATP-Gesamtgehalt vom zuvor ermittelten ATP-Gehalt der jeweiligen Probe abgezogen. Die Berechnung der ATP-Gehalte erfolgte anhand der am gleichen Tag erstellten Eichgerade.

2.5.10 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Western Blot

Proteine wurden mittels SDS-Page anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Zuerst wurde 40 mg Blattmaterial von *Nicotiana bethamiana* in flüssigem Stickstoff gemörst und mit 100 µl 5-fachem Lämmli-Puffer (62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2 % SDS, 10 % Glycerin, 5 % β-Mercaptoethanol und 0,001 % Bromphenolblau) versetzt. Die Proben wurden für 10 Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend bei 4 °C und 16100 × g für 5 Minuten zentrifugiert. Zur Auftrennung wurden 15 µl der denaturierten Proteine auf ein Gel, bestehend aus einem 5 %igen Sammelgel (30 % Acrylamid, 125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,01 % SDS, 10 % Ammoniumpersulfat (APS), 10 µl Tetramethylethylendiamin (TEMED)) und einem 12 %igen Trenngel (30 % Acrylamid, 375 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,01 % SDS, 10 % APS, 10 µl TEMED), aufgetragen. Als Standard wurde der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (von Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Aufkonzentrierung der Proteine im Sammelgel erfolgte bei 160 Volt und nicht limitierender Stromstärke, die Auftrennung im Trenngel bei 200 Volt und nicht limitierender Stromstärke.

Der Transfer der Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF) Membran wurde mit einer Mini-PROTEAN *Tetra Cell* Apparatur von Biorad nach Herstellerangaben durchgeführt. Die PVDF-Membran wurde zuerst für 15 Minuten in Methanol und danach für 2 Minuten in Wasser inkubiert. Anschließend wurde sie zusammen mit Whatman Papier (Stärke: 0,18 mm) für 5 Minuten im Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin und 20% [v/v] Methanol) gewaschen. Die Übertragung der Proteine erfolgte für 1 Stunde bei 100 Volt und nicht limitierender Stromstärke. Nach dem Transfer wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in TBS-T (50 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,001 % Tween20, 5 % [w/v] Milchpulver) blockiert. Am nächsten Tag wurde die Membran zuerst dreimal für je 5 Minuten mit TBS-T Puffer gewaschen und für 1 Stunde mit TBS-T und dem primären monoklonalen Antikörper (50 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,001 % Tween20, 5 % [w/v] Milchpulver und 1:3000 Anti-HA aus Maus, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) rotierend bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 5 Minuten mit PBS-T (137 mM NaCl, 10 mM

Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl, 1,4 mM KH₂PO₄, (pH 7,4)) gewaschen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper (1:10000 Anti-Maus mit *Horseradish Peroxidase* (HRP), Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), gelöst in PBS-T (137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl, 1,4 mM KH₂PO₄, (pH 7,4), 5 % [w/v] Milchpulver) inkubiert. Nachdem die Membran erneut dreimal für je 5 Minuten mit PBS-T gewaschen wurde, erfolgte die chemilumineszente Detektion. Die Nachweisreaktion der HRP-gekoppelten Antikörper erfolgte mit Roti®-Lumin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) nach Herstellerangaben. Dokumentiert wurde die Lichtemission mit einem ChemiLux Imager (CsX-1400 M Imager, INTAS, Göttingen, Deutschland).

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 DNA-Extraktion aus *Arabidopsis thaliana*

Bei der Isolierung genomischer *Arabidopsis thaliana*-DNA entsprechend dem Protokoll von Weigel und Glazebrook (2002) wurde ein Blatt von *Arabidopsis thaliana* in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Nach Zugabe von 400 µl Extraktionspuffer (200 mM Tris-HCl (pH 7,0), 200 mM Natriumchlorid, 25 mM EDTA, 0,5 % [w/v] SDS) wurde die Probe mit einem Pistill im Reaktionsgefäß gemörsert und 5 Minuten bei 12000 × g und Raumtemperatur zentrifugiert. 300 µl Überstand wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch die Zugabe von 300 µl Isopropanol gefällt. Danach wurde die Probe erneut für 5 Minuten bei 12000 × g und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand dekantiert, das Präzipitat mit 70 % [v/v] Ethanol gewaschen und in 50 µl Wasser resuspendiert. Bis zur Verwendung wurde die DNA bei -20 °C aufbewahrt.

2.6.2 DNA-Extraktion aus *Oryza sativa*

Oryza sativa-Blattmaterial bzw. Kallusgewebe wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert, mit 500 µl Extraktionspuffer (500 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM EDTA (pH 8,0), 0,2 % SDS) versetzt, gemischt und für 30 Minuten bei 65 °C inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl einer 24:1 Chloroform:Isoamyl Alkohol Mischung wurde die Probe gevortext und für 10 Minuten bei 12000 × g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol versetzt und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Anschließend wurde die Probe für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die DNA für 15 Minuten bei 12000 × g und Raumtemperatur gefällt. Das Pellet wurde mit 1 ml 70 % [v/v] Ethanol

gewaschen und in 50 µl Wasser gelöst. Bis zur Verwendung wurde die DNA bei -20 °C aufbewahrt.

2.6.3 Isolierung von Gesamt-RNA

Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gemörst und die Gesamt-RNA mit TRIsure (Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Je nach Größe wurde das RNA-Pellet in 30 bis 50 µl Wasser aufgenommen und anschließend die Konzentration bestimmt (2.6.4).

2.6.4 Bestimmung von RNA- und DNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung von Gesamt-RNA und DNA wurde photometrisch mit dem Spektralphotometer NanoPhotometer P300 (Implen, München, Deutschland) bei einer Optischen Dichte (OD) von 260 und 280 nm durchgeführt. 50 µg/µl doppelsträngiger DNA und 40 µg/µl RNA entsprechen bei 260 nm einer OD von eins.

2.6.5 Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Zur Herstellung von cDNA wurde pro Ansatz 0,5 µg bis 5 µg Gesamt-RNA und 100 pmol Oligo(dT)₁₅ auf 12,5 µl mit Wasser aufgefüllt. Zur Eliminierung sekundärer Strukturen wurde die RNA initial für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert, auf Eis gestellt und mit 7,5 µl Reaktionsmix (4 µl 5-fach Reaktionspuffer, 0,5 µl RiboLock Ribonuclease (RNase) Inhibitor (40 U/µL), 2 µl 40 mM dNTPs und 1 µl RevertAid Reverse Transkriptase (200 U/µL) (Life Technologies GmbH Darmstadt, Deutschland)) versetzt. Danach erfolgte für 60 Minuten die cDNA-Erststrangsynthese, die Reverse Transkriptase wurde zuletzt bei 70 °C für 10 Minuten inaktiviert. Bis zur Verwendung wurde die cDNA bei 4 °C gelagert.

2.6.6 Polymerasekettenreaktion

Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgte die Amplifizierung spezifischer DNA- bzw. cDNA-Fragmente in einem Thermozykler des Typs MJ Mini Personal Thermal Cycler und iCycler (Bio-Rad, München, Deutschland). Ein 10 × PCR-Puffer (500 mM KCl, 15 mM MgCl₂,

100 mM Tris-HCl (pH 9,0), 1 % [v/v] Triton X-100) wurde bei der PCR für die *Taq*-Polymerase verwendet.

2.6.6.1 Standard-PCR

Zur Verifizierung homozygoter T-DNA-Linien und Bestätigung positiver Klone aus *E. coli* und *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte die Synthese von DNA-Fragmenten über das Standard-PCR-Protokoll. Bei der Bestätigung positiver Klone mittels Kolonie-PCR wurde anstatt isolierter genomischer DNA ein Abstrich der Bakterienkolonie im PCR-Ansatz verwendet. Der Standard-PCR Reaktionsansatz setzte sich aus 2,5 µl 10 x PCR Puffer, 0,5 µl 20 mM dNTPs, 0,5 µl 10 µM Vorwärtsoligonukleotid und 10 µM Rückwärtsoligonukleotid, 0,3 µl *Taq*-Polymerase, 1 µl DNA und 19,7 µl H₂O zusammen. Für die Amplifizierung wurden folgende Bedingungen gewählt:

Initiale Denaturierung	94 °C	3 Minuten	
Denaturierung	94 °C	40 Sekunden	} 40 Zyklen
Oligonukleotidanlagerung	T _m -5 °C	40 Sekunden	
Elongation	72 °C	1 Minuten/kb	
Abschließende Elongation	72 °C	5 Minuten	
Kühlung	14 °C	∞	

2.6.6.2 PCR für Klonierung

Bei der Klonierung von Genen wurden cDNA-Fragmente nach Herstellerprotokoll mittels Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) amplifiziert.

2.6.6.3 PCR für Gateway-Klonierung

Bei der Gateway-Klonierung wurden die amplifizierten cDNA-Fragmente über das Gateway System nach Rozwadowski et al. (2008) in den pDONR™221 integriert. Die Oligonukleotide der ersten PCR wiesen für das zu klonierende Gen die spezifischen Sequenzen sowie eine partielle attB Rekombinationsstellen auf (Tabelle 5). Diese PCR wurde wie bei (2.6.6.2) beschrieben durchgeführt. Zur Komplettierung der attB-Rekombinationsstellen wurde anschließend mit dem Oligonukleotiden attB1_fw und dem attB2_rev die Adapter-PCR durchgeführt. Hierbei wurde 1 µl der vorhergehenden PCR als Matrize verwendet. Das Programm setzte sich wie folgt zusammen: Schritt 1: 98 °C 1 Minute, Schritt 2: 98 °C

15 Sekunden, Schritt 3: 45 °C 30 Sekunden, Schritt 4: 72 °C 1 Minute/kb (5 × Wiederholung Schritt 2-4), Schritt 5: 98 °C 15 Sekunden, Schritt 6: 55 °C 30 Sekunden, Schritt 7: 72 °C 1 Minute/kb (20 × Wiederholung Schritt 5-7), Schritt 8: 14 °C ∞. Das amplifizierte Fragment wurde anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.6.8), aus dem Gel extrahiert (2.6.9) und über die BP-Reaktion mit der BP-Clonase (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) in den pDONR™221 integriert.

2.6.6.4 Zielgerichtete Mutagenese-PCR

Die Herstellung von Punktmutationen in Genen erfolgte mittels zielgerichteter Mutagenese-PCR (Zheng et al., 2004). Zuerst wurde das zu mutierende Gen amplifiziert (2.6.6.2) und in den pGEM®-T-Vektor kloniert (2.6.13.2). Mit Oligonukleotiden (Anhang, Tabelle 4), welche die gewünschte Punktmutation enthielten, erfolgte nach Herstellerangaben eine PCR mit der Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland). Abweichend von dem Standard-PCR Protokoll wurde die Zyklenzahl der Denaturierung, Oligonukleotidanlagerung und Elongation auf 12 Zyklen reduziert. Das Produkt wurde aufgereinigt (2.6.9), mit dem Restriktionsenzym *DpnI* (2.6.7) verdaut und anschließend in *E. coli* transformiert (2.4.3). Da *DpnI* methylierungssensitiv ist, wurde lediglich der ursprünglich aus *E. coli* isolierte Vektor ohne Punktmutation, jedoch nicht der neu amplifizierte Vektor verdaut. Einzelne Kolonien wurden in flüssigem LB-Medium angezogen, das Plasmid isoliert und zur Verifizierung der Punktmutation sequenziert (2.6.10).

2.6.6.5 Semi-quantitative PCR

Die Analyse der Genexpression erfolgte über die Semi-quantitative PCR. Dabei wurde cDNA als Vorlage für die Amplifizierung von Fragmenten verwendet. Die PCR wurde mit Standardreaktionsansatz unter Standardbedingungen durchgeführt, jedoch wurde abweichend davon die Anzahl der Zyklen des PCR-Programms dem zu untersuchenden Gen angepasst.

2.6.7 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau wurde für die Herstellung von DNA-Fragmenten zur Ligation und für die Verifizierung von Klonierungen verwendet. Bei der Überprüfung von Klonierungen wurden idealerweise Restriktionsendonukleasen gewählt, die sowohl im Vektor als auch im inserierten DNA-Fragment schnitten. Damit konnte die Orientierung der Insertion bestätigt werden.

Standard Restriktionsansatz:

Plasmid-DNA/PCR Fragment (1 bis 3 µg)	x	µl
Restriktionsendonukleasen (10 Unit × µl ⁻¹)	0,5	µl
Puffer	1,5	µl
H ₂ O	x	µl
Endvolumen	15	µl

Die Restriktion wurde für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Fragmente des Restriktionsverdaus wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.6.8) und bei Klonierungen zusätzlich aufgereinigt (2.6.9).

2.6.8 Agarosegelelektrophorese

Die Visualisierung der aus der PCR-Reaktion amplifizierten DNA- und cDNA-Fragmente erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Dabei wurden Gele mit 1 % [w/v] Agarose in 1 × TAE-Puffer (40 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA und 11,4 % [v/v] Eisessig) hergestellt. Als Laufpuffer wurde 1 × TAE-Puffer (40 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA und 11,4 % [v/v] Eisessig) verwendet. Die Proben wurden mit 6-fachem Ladepuffer (0,1 % [w/v] Bromphenolblau, 30 % [w/v] Glycerol) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Zur Verifizierung der Größe und Konzentration der amplifizierten Fragmente wurde der DNA-Standard GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. Die Fragmente wurden bei 100 V aufgetrennt und über das im Gel enthaltene 0,002 % [v/v] Serva DNA Stain G (SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland) an einer Geldokumentationsanlage bei UV-Licht betrachtet.

2.6.9 Aufreinigung von PCR-Fragmenten und Gelextraktion

Die Aufreinigung amplifizierter DNA-Fragmente wurde mit dem *GeneJET PCR Purification Kit* (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die Extraktion zuvor amplifizierter und zusätzlich gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmente (2.6.8) erfolgte mittels *GeneJET Gel Extraction Kit* (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers.

2.6.10 Sequenzierung

Zur Verifizierung wurden klonierte Fragmente von LGC Genomics (Berlin, Deutschland) sequenziert. Die Auswertung erfolgte mit BioEdit Sequence Alignment Editor (V7.0.5.3).

2.6.11 Infiltration in *Nicotiana benthamiana*

2 ml YEB-Medium (Rifampicin 50 µg/ml; Kanamycin 50 µg/ml) wurden mit dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm LBD4404 inokuliert und über Nacht bei 28 °C und 220 rpm in sterilen Kulturröhrchen angezogen. Mit 0,5 ml dieser Vorkultur wurde am nächsten Tag ein 50 ml Hauptkultur (YEB-Medium mit 10 mM Mes-KOH (pH 5,2) steril filtriert und 0,02 mM Acetosyringon in Dimethylsulfoxid (DMSO)) angeimpft und ebenfalls über Nacht bei 28 °C und 220 rpm kultiviert. Diese Hauptkultur wurde anschließend bei 3220 × g und 4 °C für 20 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 20 ml VE-Wasser resuspendiert und erneut bei 3220 × g und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in Infiltrationspuffer (MES-KOH (pH 5,2), 10 mM MgCl₂, 10 mM, 0,1 mM Acetosyringon) aufgenommen und eine OD bei 600 nm von 1 eingestellt. Die Bakteriensuspension wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und danach mit einer 1 ml-Spritze in die Unterseite der *Nicotiana benthamiana*-Blätter infiltriert. Die Pflanze wurden für drei Tage unter Langtagbedingungen mit einem Tag-/Nacht rhythmus von 16 Stunden Licht (70 µmol Photonen m⁻² s⁻¹) bei 24 °C inkubiert und anschließend die Blätter geerntet.

2.6.12 Anreicherung und Behandlung von Chloroplasten aus *N. benthamiana*

Infiltrierte *N. benthamiana* Pflanzen wurden jeweils für 1 Stunde bei 100 µmol Photonen m⁻² s⁻¹ oder mit Dunkelheit vorbehandelt. Anschließend wurden 5 infiltrierte Blätter in Extraktionspuffer (0,4 M Saccharose, 20 mM Tricin, 10 mM NaCl (pH 8,0) mit NaOH) homogenisiert und durch 6 Lagen Mullstoff (Wero Medical, Taunusstein, Deutschland) filtriert. Die Hälfte des filtrierten Homogenisats wurde für 1 Stunde mit 1000 µmol Photonen m⁻² s⁻¹ illuminiert, die andere Hälfte für 1 Stunde im Dunkeln inkubiert. Danach wurde das Homogenisat bei 1800 × g für 2 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in flüssigen Stickstoff eingefroren.

2.6.13 Herstellung transgener Pflanzen

2.6.13.1 Herstellung von RNAi-Konstrukten für *Oryza sativa* und *Arabidopsis thaliana*

Zur funktionellen Charakterisierung von *OsPFPβ* und *AtPFK5* wurden *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* RNAi-Linien dieser Gene erzeugt. Für die Klonierung der Gene wurde das Gateway-System nach Rozwadowski et al. (2008) verwendet. Zuerst wurde RNA aus *Oryza sativa* ssp. Japonica des cv. Nipponbare und aus *Arabidopsis thaliana* Col-0 isoliert (2.6.3), in cDNA umgeschrieben (2.6.5) und das cDNA-Fragment für die RNAi-Kassette mit den angegebenen Oligonukleotiden (Tabelle 5) amplifiziert (2.6.6.2). Das PCR-Fragment wurde anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.6.8), aufgereinigt (2.6.9) und über die BP-Reaktion mit der BP-Clonase (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) in den Eingangsvektor pDONR™221 integriert. Die Verifizierung der Klonierung erfolgte mittels Kolonie-PCR (2.6.6.1), Restriktionsverdau (2.6.7) und Sequenzierung (2.6.10). Abschließend wurden positive Klone über die LR-Reaktion mit der LR-Clonase in den Zielvektor pH7GWIWG2,0 (Karimi et al., 2007) rekombiniert und mittels Kolonie-PCR und Restriktionsanalyse überprüft.

Für die Herstellung des Estradiol-induzierbaren pMDC7/pjawohl:OsPFPβ RNAi-Konstruktes wurde in den Vektor pJawohl17 (bereitgestellt von Imre Somsich und Bekir Ulker, Köln, Deutschland) die RNAi-Kassette in den pGATA-Vektor (Mustroph et al., 2010) kloniert. Anschließend wurde der Estradiol-induzierbare Promoter aus dem pMDC7 (Curtis und Grossniklaus, 2003) in diesen Vektor kloniert. In den neu entstandenen pMDC7/pjawohl Vektor wurde danach das OsPFPβ RNAi-Konstrukt über die Gateway-Klonierung integriert.

2.6.13.2 Überexpressionskonstrukte in *Nicotiana benthamiana*

Zum Zweck der Subklonierung und anschließender zielgerichteter Mutagenese-PCR der *AtPFK3*- und *AtPFK5*-Gene wurde die multiple Klonierungsstelle des pGEM®-T-Vektors verändert. Mit den Oligonukleotiden pGEMT_revcl und pGEMT_fwcl (Anhang, Tabelle 4), die Überhänge mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen trugen, wurde der gesamte pGEM®-T-Vektor amplifiziert, mittels Gelextraktion (2.6.9) aufgereinigt und über T4-DNA Ligase (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) nach Herstellerangaben verknüpft. Der neue Polylinker kodierte zur Klonierung des *AtPFK3*-Gens die *Bam*HI und *Xba*I und für das *AtPFK5*-Gen die *Kpn*I und *Xba*I Restriktionsschnittstellen. Zur Herstellung von Punktmutationen wurde das wildtypische *AtPFK3*- und *AtPFK5*-Gen aus cDNA amplifiziert und in den modifizierten pGEM®-T-Vektor kloniert. Durch zielgerichtete Mutagenese-PCR (2.6.6.4) erfolgte

anschließend unter Gebrauch der in Tabelle 4 (Anhang) aufgelisteten Oligonukleotide die Anfertigung der spezifischen Punktmutationen. Die durch Sequenzierung verifizierten Fragmente mit Punktmutation wurden über Restriktionsverdau (2.6.7) aus dem pGEM®-T-Vektor herausgeschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.6.8), aus dem Gel extrahiert (2.6.9) und in den pBinAR (Höfgen und Willmitzer, 1990) nach der bei Mustroph et al. (2007) beschriebenen Klonierungsstrategie ligiert.

Unter Verwendung der in Tabelle 5 (Anhang) genannten Oligonukleotide (PFK_HA-tag_fw, PFK_HA-tag_rev, cHA-PFK_fw, cHA-PFK_rev) wurde aus dem pHBTl-HA (Wehner, 2012) der HA-Tag amplifiziert und in die von Mustroph et al. (2007) hergestellten pBinAR:PFK1, 3, 6 und 7 Konstrukte und den pBinAR:PFK5 kloniert. Die N-terminale Klonierung erfolgte über das Restriktionsenzym *KpnI*, während die C-terminale Klonierung mit Hilfe der Restriktionsenzyme *SpeI* und *PstI* durchgeführt wurde.

2.6.13.3 Transformation von *Oryza sativa*

Oryza sativa ssp. Japonica cv. Nipponbare wurden oberflächlich sterilisiert. 20 entspelzte Karyopsen wurden in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit 1,5 ml 100 % Ethanol überschichtet und für 1 Minute bei 1400 rpm geschüttelt. Das Ethanol wurde unter sterilen Bedingungen dekantiert, mit 1,5 ml 3 % Natriumhypochlorid (mit 100 µl Tween 20 pro 50 ml) ersetzt und weitere 30 Minuten bei 1400 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Samen 5 mal mit sterilem Wasser gewaschen, auf N6D-Medium platziert und die Kallusbildung für 7 Tage bei konstanter Lichtzufuhr induziert.

Die Herstellung transgener *Oryza sativa*-Pflanzen wurde nach Toki et al. (2006) durchgeführt. Die Selektion von resistentem Kallus erfolgte mit 50 µg/ml Hygromycin B und 300 µg/ml Carbenicillin. Abweichend vom Protokoll wurden bei der Selektion von resistentem Kallus die Samen alle 2 Wochen bis zu 2 Monate lang auf frische N6D-Platten transferiert. In dieser Zeit wurde auf wuchernden Kallus geachtet. Dieser wurde anschließend zur Sprossregeneration auf REIII-Medium transferiert und bei konstanter Lichtzufuhr inkubiert. 1 bis 2 cm große Sprosse wurden zur Wurzelinduktion auf HF-Medium überführt und unter Kurztagbedingungen mit 10 Stunden Licht ($330 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bei 28 °C in durchsichtigen dünnwandigen Plastikgefäßen bis zu einer Größe von ca. 10 cm angezogen. Die regenerierten Pflanzen konnten dann auf Erde überführt werden. Zur Etablierung der Reistransformation wurde der Vektor pXHB7FNFI-UBIL (Karimi et al., 2007) verwendet. Der Vektor kodiert ein konstitutiv exprimiertes GFP. Durch das im GFP eingefügte Intron konnte auf cDNA Ebene die bakterielle von der pflanzlichen Expression differenziert werden. Für die Etablierung des Estradiol-induzierbaren Konstrukts wurde zuerst GFP aus dem pXHB7FNFI-UBIL amplifiziert (2.6.6.3)

(Anhang, Tabelle 5) und über die BP-Reaktion mit der BP-Clonase (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) in den Eingangsvektor pDONR™221 integriert. Abschließend wurden zuvor durch Sequenzierung verifizierte positive Klone über die LR-Reaktion mit der LR-Clonase in den Zielvektor pMDC7 (Curtis und Grossniklaus, 2003) rekombiniert, mittels Kolonie-PCR (2.6.6.1) und Restriktionsanalyse (2.6.7) überprüft und in *Oryza sativa* transformiert.

2.6.13.4 Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Zur Herstellung transgener *Arabidopsis thaliana* wurden transformierte *Agrobacterium tumefaciens* vom LBD4404-Stamm (Hoekema et al., 1983) in 2 ml flüssigem YEB-Medium bei 28 °C und 220 rpm über Nacht geschüttelt. 0,5 ml dieser Vorkultur wurden verwendet, um eine 50 ml YEB-Medium Hauptkultur anzuimpfen und erneut über Nacht bei 28 °C und 220 rpm zu kultivieren. Die Suspension wurde anschließend bei 3220 × g und Raumtemperatur für 20 Minuten zentrifugiert und im Infiltrationsmedium (0,02 % [w/v] Silvet L-77 (Kurt Obermeier GmbH & Co. KG, Bad Berleburg, Deutschland), 5 % [w/v] Saccharose) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 resuspendiert. Die Infloreszenzen der zu transformierenden Pflanzen wurden für 5 Sekunden in die Bakteriensuspension gehalten und für 24 Stunden liegend im Dunkeln inkubiert. Die Samen dieser Pflanzen wurden 4 Wochen später geerntet, sterilisiert und auf MS-Plattem mit 50 µg/ml Hygromycin B selektiert.

2.6.13.5 Kreuzung von *Arabidopsis thaliana*

Die homozygoten T-DNA-Insertionslinien *pfk3* (Salk_125458), *pfk6* (Salk_048795), *pfpa1-1* (Salk_056908C), *pfpa2-2* (GK-865E04), *pfpβ1-1* (Salk_111562) und *pfpβ2-1* (Salk_025504) wurden bis zur Blütenreife (2.2.2) angezogen. Individuen mit verschlossenen Blüten wurden ausgewählt. Am Binokular wurden mit einer Feinpinzette die Sepalen, Petalen und das Stamina entfernt. Auf das freigelegte, unbeschädigte Karpell wurde mit reifen Staubblättern Pollenstaub auf die Oberfläche der Narbe transferiert. Die gekreuzten Blüten wurden markiert und bis zur Samenreife unter Langtagbedingungen mit einem Tag-/Nachtrhythmus von 16 Stunden Licht (80 µmol Photonen m⁻² s⁻¹) bei 24 °C angezogen. Die heterozygoten Pflanzen der F1-Generation wurden auf Erde bis zur Samenreife unter Langtagbedingungen mit einem Tag-/Nachtrhythmus von 16 Stunden Licht (80 µmol Photonen m⁻² s⁻¹) bei 24 °C angezogen. Die Samen der F2-Generation wurden ebenfalls erneut auf Erde unter Standardbedingungen angezogen. Aus Blattmaterial der Pflanzen der F2-Generation wurde anschließend DNA isoliert und über PCR auf die Homozygotie beider T-DNA-Insertionsallele

getestet. Die Samen der Pflanzen, bei denen beide T-DNA-Insertionsallele homozygot vorlagen, wurden für Versuche verwendet.

Tabelle 3: Verwendete T-DNA-Insertionslinien und in dieser Arbeit verwendeter Arbeitstitel.

Gekreuzte T-DNA-Insertionslinien		Arbeitstitel
Salk_125458	Salk_048795	<i>pfk3</i> × <i>pfk6</i>
Salk_056908C	GK-865E04	<i>pfpa1-1</i> × <i>pfpa2-1</i>
Salk_111562	Salk_025504	<i>pfpβ1-1</i> × <i>pfpβ2-1</i>

2.7 Computerprogramme, Datenbankrecherche und Sequenzanalysen

Zur statistischen Absicherung wurden Varianzanalysen (*analysis of variance*; ANOVA) mit anschließendem Post-hoc-Test (Tukey-Test) durchgeführt. Als alternative wurde ebenfalls der T-Test verwendet. Benutzt wurde Sigma Plot 11.0 (Systat Software, Inc., San Jose California USA). Die signifikanten Unterschiede zwischen den Datensätzen wurden entsprechend gekennzeichnet.

Die Struktur der PFK3, 4 und 5 wurde mit *phyre2* (Kelley und Sternberg, 2009) vorhergesagt und das Modell der PFK3, 4 und 5 mit PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC) graphisch aufgearbeitet und visualisiert.

Zur phylogenetischen Analyse wurden sämtliche PFK-Aminosäuresequenzen von *Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula*, *Solanum lycopersicum*, *Oryza sativa*, *Brachypodium distachyon*, *Sorghum bicolor*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Volvox carteri* von Phytozome 10.1 (Goodstein et al., 2012) bezogen. Die *Trypanosoma brucei brucei* PFK Aminosäuresequenz wurde von NCBI (Wheeler et al., 2003) bezogen. Das Alignment der PFKs wurde mit ClustalW (Larkin et al., 2007) durchgeführt. Die Darstellung des Stammbaumes wurde mit geneious (Kearse et al., 2012) vorgenommen. Die Konsensussequenz des Alignments wurde mit weblogo (Crooks et al., 2004) illustriert.

Zusätzliche Information zu Protein-, DNA- und cDNA-Sequenzen wurden über The Rice Genome Annotation Resource (TIGR) (Kawahara et al., 2013) oder The Arabidopsis Information Resource (TAIR) (Swarbreck et al., 2008) erlangt.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der OsPFP β T-DNA-Insertionsmutante in *Oryza sativa*

Ende der 80er Jahre wurde die PFP auf biochemischer und molekularbiologischer Ebene ausgezeichnet analysiert. Das Protein phosphoryliert reversibel Fru6P zu Fru1,6BP, wobei diese Reaktion in der Zelle nahe am Gleichgewicht abläuft (Weiner et al., 1987). Diese biochemische Eigenschaft erschwert die Determinierung der funktionellen Bedeutung dieses Proteins für die Pflanze. Bekannt ist, dass das PFP-Enzym durch Fru2,6BP aktiviert wird (Stitt, 1990). Bislang konnte gezeigt werden, dass die Expression von *PFP*-Genen in Reiskeimlingen sowie in adulten Reispflanzen unter anoxischen Bedingungen induziert ist (Mertens, 1991; Lasanthi-Kudahettige et al., 2007; Mustroph et al., 2013). Zudem konnte bei Anoxie in Reis eine erhöhte PFP-Aktivität beobachtet werden (Mertens et al., 1990). Das PFP-Enzym besteht aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten. Dabei bildet die regulatorisch aktive α -Untereinheit mit der katalytisch aktiven β -Untereinheit grundsätzlich einen Heterotetramer (Yan und Tao, 1984; Kruger und Dennis, 1987; Wong et al., 1990; Todd et al., 1995; Theodorou und Plaxton, 1996).

Welche Bedeutung das Enzym für die Reispflanze hat, ist jedoch bislang ungeklärt und sollte Anhand von Deletionsmutanten des Gens in dieser Arbeit untersucht werden. Das Reisgenom kodiert ausschließlich für eine PFP β -Untereinheit, die den katalytischen Bestandteil des Enzyms darstellt. Deshalb wurde zur funktionellen Charakterisierung des *Oryza sativa* (*Os*)*PFP* β -Gens die T-DNA-Insertionsmutante PFG_2D-31392.R analysiert. In Reis besteht das Gen aus 15 Exons, wobei die T-DNA-Insertion in Exon 13 des Gens lokalisiert ist (Abbildung 3 A).

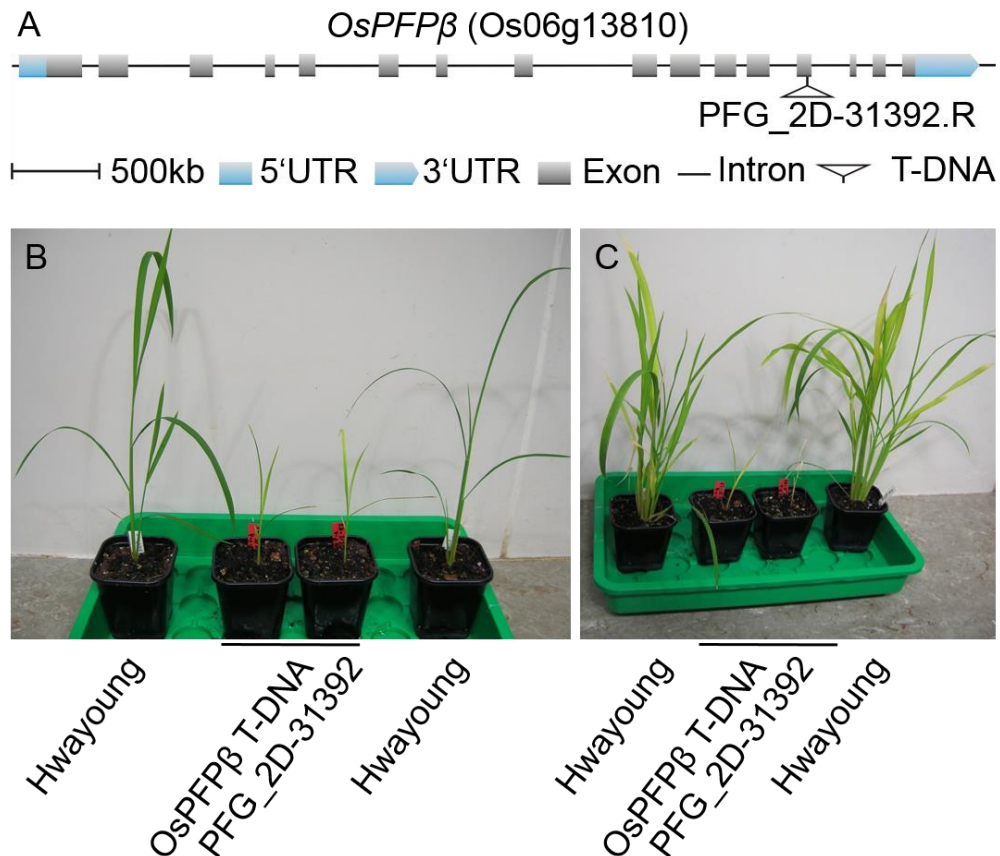


Abbildung 3: Phänotypisierung der *OsPFPβ* T-DNA-Insertionsmutante PFG_2D-31392.R. (A) Schematisiert ist die *OsPFPβ*-Genstruktur (Os06g13810) mit Position der T-DNA-Insertion PFG_2D-31392.R. Graue Bereiche stellen die Exons, hellblaue Bereiche die *untranslated region* (UTR) dar. Die durchgezogene schwarze Linie repräsentiert die Introns. Die Position der T-DNA PFG_2D-31392.R ist mit einem schwarzen Dreieck wiedergegeben. (B, C) Flankiert von zwei *Oryza sativa* ssp. Japonica cv. Hwayoung Wildtyppflanzen sind jeweils zwei homozygote Individuen der *OsPFPβ* T-DNA-Insertionsmutante nach (B) 33 Tagen und (C) 76 Tagen Anzucht unter Langtagbedingungen (Bilder von Mustroph).

Die zuvor von Mustroph als homozygot identifizierten Pflanzen der *OsPFPβ* T-DNA-Insertionsmutante PFG_2D-31392.R zeigten nach 33 Tagen im Vergleich zu dem *Oryza sativa* ssp. Japonica cv. Hwayoung Wildtyp ein deutlich reduziertes Wachstum. Nach 76 Tagen konnte keine zusätzliche Zunahme an Biomasse bei den homozygoten Individuen beobachtet werden und die Pflanzen sind anschließend abgestorben (Abbildung 3 B, C). Die homozygote *OsPFPβ* T-DNA-Insertionsmutante wies nach 2,5 Monaten einen letalen Phänotyp auf. Aus diesem Grund wurden mehrere Samen dieser Linie zur Kallusinduktion auf N6D-Medium kultiviert. Der Leitgedanke war die Vervielfältigung hetero- und homozygoter Pflanzen durch die Regeneration mehrerer Pflanzen aus Kallusgewebe eines homo- und heterozygoten Reissamens.

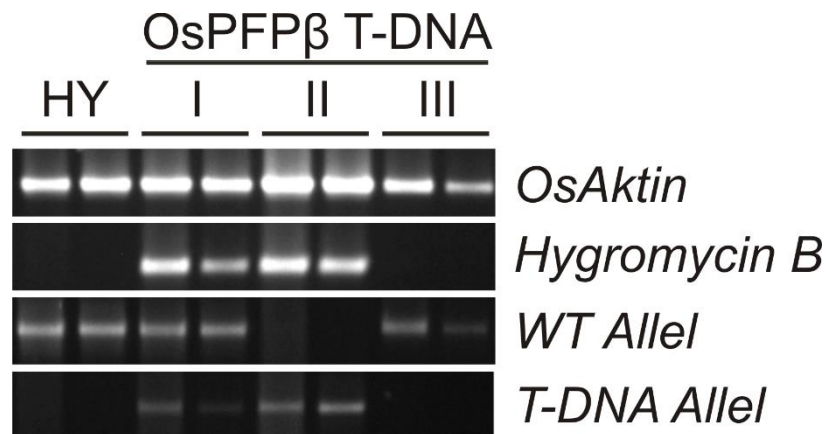


Abbildung 4: Analyse putativer homozygoter Linien der OsPFP β (Os06g13810) T-DNA-Insertionsmutanten PFG_2D-31392.R. Dargestellt sind die PCR-Fragmente, die mit den wildtypspezifischen, T-DNA-allelspezifischen Oligonukleotiden sowie mit Oligonukleotiden für den Selektionsmarker Hygromycin B aus genomischer DNA des *Oryza sativa* ssp. Japonica cv. Hwayoung Wildtyps (HY) und ausgewählten Individuen der T-DNA-Insertionsmutante PFG_2D-31392.R (I, II und III) amplifiziert wurden. Als Ladekontrolle wurde *OsAktin* verwendet. Die DNA-Fragmente wurden in einem 1 % [w/v] Agarosegel aufgetrennt und mit Serva-Stain angefärbt.

Mehrere Samen der T-DNA-Insertionsmutante PFG_2D-31392.R und des *Oryza sativa* ssp. Japonica cv. Hwayoung Wildtyps wurden parallel auf N6D-Medium ohne Selektionsmarker angezogen. Aus dem entstandenen Kallusgewebe wurde anschließend die DNA isoliert und analysiert (Abbildung 4). Zuerst wurde als Ladekontrolle für den Wildtyp und die drei T-DNA-Insertionslinien *OsAktin* amplifiziert. Die Linie OsPFP β T-DNA III wies neben der *OsAktin* Ladekontrolle ausschließlich das wildtypische Allel auf. Daneben konnten bei den zwei Linien OsPFP β T-DNA I und II sowohl Fragmente für das T-DNA-Allel als auch für den Selektionsmarker *Hygromycin B* amplifiziert werden. Für die OsPFP β T-DNA I konnte zudem ein Fragment für das wildtypische Allel amplifiziert werden, während bei der T-DNA-Linie II kein Wildtyp-Allel detektiert werden konnte. Genotypisch handelte es sich bei der T-DNA II um ein homozygotes und bei der T-DNA I um ein heterozygotes Kallusgewebe der T-DNA-Insertionsmutante PFG_2D-31392.R. Darüber hinaus wurde das Kallusgewebe der drei unterschiedlichen T-DNA-Linien zur weiteren Verifizierung auf N6D-Medium mit 50 μ g/ml Hygromycin B ausgelegt (Abbildung 5 A).

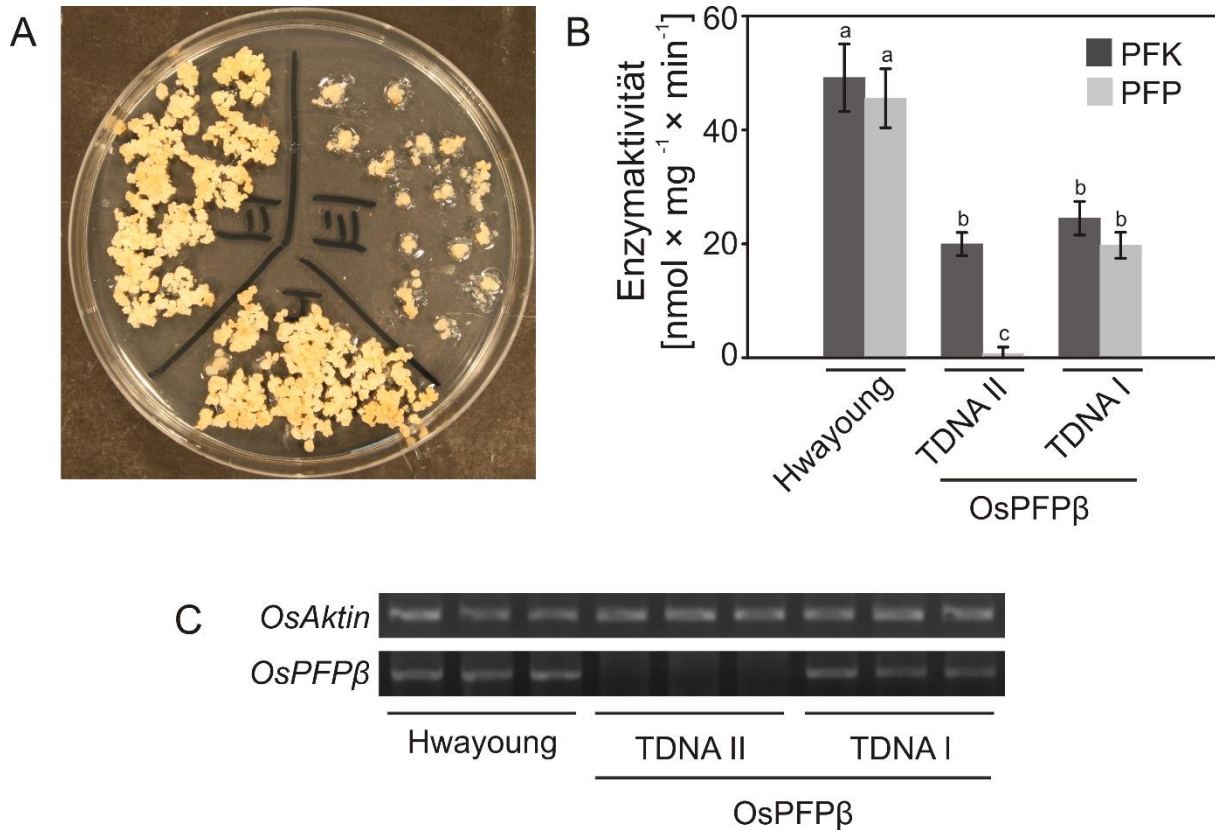


Abbildung 5: Analyse putativer homozygoter Linien der OsPFPβ (Os06g13810) T-DNA-Insertionsmutanten PFG_2D-31392.R. (A) Ausgewählte Linien der OsPFPβ T-DNA-Insertionsmutante PFG_2D-31392.R wurden für zwei Wochen auf Kallusinduktions-Medium mit 50 µg/ml Hygromycin B angezogen. (B) Kallus vom *Oryza sativa* ssp. Japonica cv. Hwayoung Wildtyp sowie den T-DNA-Insertionslinien I und II wurde für 10 Tage auf Induktionsmedium ohne Selektionsmarker kultiviert, geerntet und gemörsert. Aus dem Kallusgewebe wurden Proteine extrahiert und die PFP- sowie die PFK-Aktivität analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung (SD). Verschiedene Buchstaben indizieren signifikante Unterschiede (Anova und Tukey Test, $p > 0,001$, $n=6$). (C) Für Expressionsanalysen wurde aus 10 Tage altem Kallusgewebe vom *Oryza sativa* ssp. Japonica cv. Hwayoung Wildtyp sowie den T-DNA-Insertionslinien I und II RNA isoliert und die *OsPFPβ*-Expression analysiert. Als Ladekontrolle diente *OsAktin*. Die cDNA-Fragmente wurden in einem 1 % [w/v] Agarosegel aufgetrennt und mit Serva-Stain angefärbt.

Bei dem zuvor als hetero- bzw. homozygot identifizierten Kallusgewebe der T-DNA-Insertionslinien I und II konnte auf Medium mit dem Selektionsmarker Hygromycin B Kallus-Wachstum beobachtet werden. Die zuvor als wildtypisch identifizierte T-DNA-Linie III wies im Gegensatz dazu kein Kallus-Wachstum auf Medium mit Selektionsmarker auf (Abbildung 5 A). Daneben wurde die PFP- und PFK-Aktivität des *Oryza sativa* ssp. Japonica cv. Hwayoung Wildtyps und der hetero- bzw. homozygoten OsPFPβ T-DNA-Insertionslinie I und II analysiert (Abbildung 5 B). Der wildtypische Kallus wies eine PFP-Aktivität von $45,5 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ auf. Bei der heterozygoten OsPFPβ T-DNA-Linie I konnte eine PFP-Aktivität von $19,7 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ bestimmt werden. Die homozygote T-DNA-Linie II verursachte im

Gegensatz dazu einen kompletten Verlust der PFP-Aktivität. Um auszuschließen, dass ein genereller Wachstumsdefekt die nicht vorhandene PFP-Aktivität bei der homozygoten T-DNA-Linie II hervorgerufen hatte, wurde zur Kontrolle ebenfalls die PFK-Aktivität des Wildtyps und beider T-DNA-Linien bestimmt. Sowohl beim Wildtyp als auch bei beiden T-DNA-Linien konnte eine PFK-Aktivität zwischen 49,2 und 20,0 nmol \times mg⁻¹ \times min⁻¹ ermittelt werden. Aus dem Hwayoung Wildtyp sowie aus der homo- bzw. heterozygoten T-DNA-Linie wurde RNA isoliert. Das *OsPFP β* -Transkript war im Gegensatz zum Wildtyp und der heterozygoten T-DNA-Linie I in der homozygoten T-DNA-Linie II nicht mehr nachweisbar (Abbildung 5 C).

Anschließend wurde das Kallusgewebe der hetero- bzw. homozygoten Linien zur Vervielfältigung von Pflanzen auf Spross-Regenerationsmedium transferiert. Heterozygotes Sprossgewebe sowie anschließend auch Pflanzen konnten regeneriert werden. Aus dem homozygoten Kallusgewebe der TDNA Linie II konnte hingegen keine Spross-Regeneration erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend zeigten als homozygot verifizierte Pflanzen der *OsPFP β* T-DNA-Insertionsmutante PFG_2D-31392.R nach 2,5 Monaten einen letalen Phänotyp, das zu dieser Mutante korrespondierende Kallusgewebe wies keine PFP-Aktivität auf und war nicht in der Lage, Sprossgewebe zu regenerieren.

3.2 Etablierung der Reistransformation

Da bisherige Bemühungen, homozygote *OsPFP β* T-DNA-Insertionsmutanten zu isolieren, gescheitert waren, wurde zur Herstellung von transgenen Pflanzen im Labor ein Protokoll für die Transformation von *Oryza sativa* ssp. Japonica cv. Nipponbare etabliert.

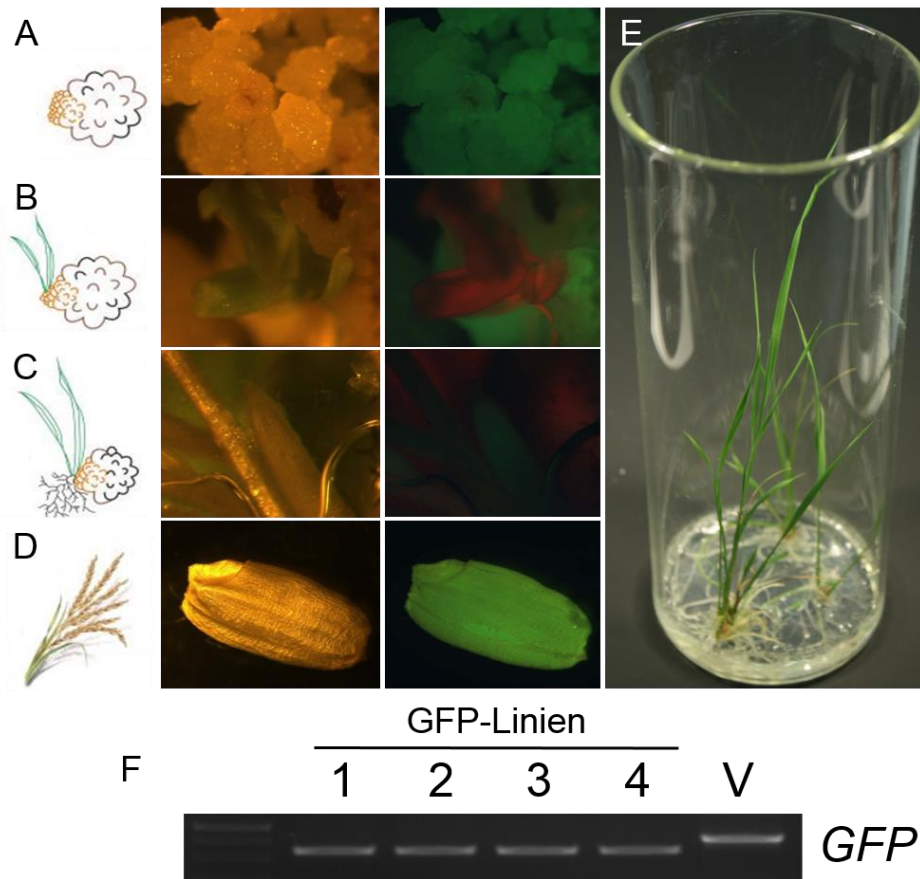


Abbildung 6: Etablierung der Reistransformation mit einem konstitutiv exprimierten grün fluoreszierenden Protein (*green fluorescent protein*, GFP) anhand von verschiedenen Entwicklungsstadien. Verwendet wurde der Vektor pXHB7FNFI-UBIL (Karimi et al., 2007), selektiert wurde mit 50 µg/ml Hygromycin B. Dargestellt sind GFP- und Durchlichtaufnahmen, durchgeführt mit einem Leica MZ FLIII von: (A) resistentem Kallusgewebe, (B) resistentem Kallusgewebe mit regenerierendem Spross, (C) induzierter Wurzelregeneration, (D) ausgereiftem Samen einer regenerierten Reispflanze; weiterhin die Aufnahme (E) regenerierter, 2 Wochen alter Reispflanzen, angezogen auf Wurzel-Induktionsmedium mit 50 µg/ml Hygromycin B. (F) Für Expressionsanalysen wurde aus 10 Tage altem Kallusgewebe ausgewählter resistenter GFP-Linien 1 bis 4 RNA isoliert und die GFP-Expression analysiert. Amplifiziert wurde das mit einem Intron versehene konstitutiv exprimierte GFP. Der Vektor (V) diente als Kontrolle. Die DNA-Fragmente wurden in einem 1 % [w/v] Agarosegel aufgetrennt und mit Serva-Stain angefärbt.

Als Grundlage für die Etablierung der Reistransformation wurde das Protokoll von Toki et al. (2006) verwendet. Zu diesem Zwecke wurde der Vektor pXHB7FNFI-UBIL (Karimi et al., 2007) in *Oryza sativa* ssp. Japonica cv. Nipponbare transformiert. Dieser Vektor kodiert ein konstitutiv exprimiertes grün fluoreszierendes Protein (*green fluorescent protein*, GFP) als Reportergen, in dessen Sequenz ein Intron integriert war. Da bakterielle *messenger* RNA (mRNA) keiner RNA-Prozessierung unterliegt, stellt das primäre Transkript die „reife“ mRNA dar. So konnte das Intron im GFP nur von pflanzlichen Kalluszellen oder Organen gespleißt

und ordnungsgemäß translatiert werden. Unter Verwendung eines Leica MZ FLIII Binokulars konnte die GFP-Fluoreszenz der transformierten Reispflanzen während unterschiedlicher Entwicklungsstadien analysiert werden (Abbildung 6). Beim resistenten Kallusgewebe sowie dem ausgereiften Samen wurde GFP-Fluoreszenz beobachtet (Abbildung 6 A, D). Mit deutlich geringerer Intensität als beim Kallus konnte ebenfalls in der Wurzelspitze GFP-Fluoreszenz ermittelt werden (Abbildung 6 C). Aufgrund der starken Primärfluoreszenz des Chlorophylls wurde im Spross kein GFP detektiert (Abbildung 6 B).

Darüber hinaus wurde aus verschiedenen resistenten Kallusgeweben, bei denen bereits GFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden konnte, RNA isoliert und die *GFP*-Expression analysiert. Über das im GFP integrierte Intron konnte die pflanzliche von bakterieller Expression unterschieden werden. Aus allen vier Linien wurde mit GFP-spezifischen Oligonukleotiden ein cDNA-Fragment von ca. 500 Basenpaaren (bp) amplifiziert. Wenn das Intron herausgeschnitten wurde, entsprach dies der zu erwartenden Fragmentgröße von 486 bp. Als Kontrolle wurde direkt aus dem Vektor das GFP mit Intron amplifiziert. Das hierfür zu erwartende DNA-Fragment von 675 bp korrespondierte mit dem amplifizierten Fragment von ca. 700 bp (Abbildung 6 F).

Anfängliche Analysen der OsPFPβ T-DNA-Insertionsmutanten PFG_2D-31392.R ergaben, dass die komplette Gendeletion potenziell letal für die Pflanze war. So wurde zusätzlich zu der allgemeinen Reistransformation die Transformation eines Estradiol-induzierbarem Konstruktes etabliert.

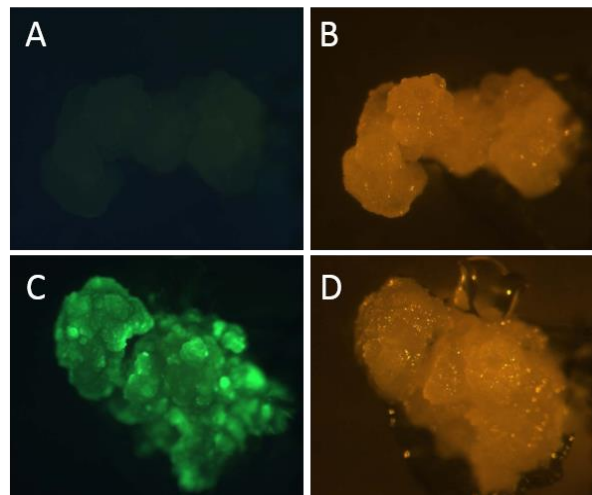


Abbildung 7: Etablierung der Reistransformation unter Verwendung des Estradiol-induzierbaren pMDC7:GFP-Konstruktes. Hygromycin B-resistentes und nicht resistentes Kallusgewebe wurde für 24 Stunden auf N6D-Medium mit 5 μ mol Estradiol angezogen. (A, B) GFP- und Durchlichtaufnahme von nicht resistentem Kallusgewebe, (C, D) GFP- und Durchlichtaufnahme von resistentem Kallusgewebe. Die Aufnahmen wurden mit einem Leica MZ FLIII durchgeführt.

Die Estradiol-kontrollierte Expression eines OsPFP β RNAi-Konstruktes ermöglicht eine temporale und somit auch gezielte Regulation der OsPFP β -Expression. Diese Technik ist besonders von Vorteil, wenn das zu untersuchende Gen essentiell für das Wachstum der Pflanze ist und eine komplette Deletion dieses Gens letal ist. So wurde hierfür GFP in den pMDC7 kloniert, einen Vektor mit Estradiol-induzierbarem Promoter, anschließend in Reis transformiert und Hygromycin B resistentes Kallusgewebe nach Okuzaki et al. (2011) auf N6D-Medium mit 5 μ mol Estradiol für 24 Stunden angezogen und die GFP-Fluoreszenz bestimmt. Als Kontrolle wurde nicht transformierter Kallus verwendet. Bei dem resistenten Kallus konnte im Vergleich zum nicht transformierten Kallusgewebe nach 24 Stunden auf 5 μ mol Estradiol eine starke Induktion der GFP-Fluoreszenz beobachtet werden (Abbildung 7). Nach der Etablierung der Transformation wurde versucht, sowohl das konstitutive pH7GWIWG2,0:OsPFP β RNAi-Konstrukt als auch das Estradiol-induzierbare pMDC7/pjwohl:OsPFP β RNAi-Konstrukt in *Oryza sativa* ssp. Japonica cv. Nipponbare zu transformieren. Im Gegensatz zum pH7GWIWG2,0:OsPFP β -Konstrukt konnten keine Transformanten von Reis mit pMDC7/pjwohl:OsPFP β beobachtet werden.

3.3 Analyse der Reis PFP β RNAi-Konstrukte der T1-Generation

Nach ersten Untersuchungen führte die T-DNA-Insertionsmutante PFG_2D-31392.R zum kompletten Verlust der entsprechenden OsPFP β -mRNA und einer kompletten Inhibition der PFP-Aktivität. Lediglich aus heterozygotem, jedoch nicht aus homozygotem Kallusgewebe

konnten Pflanzen regeneriert werden. Zur funktionellen Analyse des *OsPFPβ*-Gens wurden deshalb konstitutive pH7GWIWG2,0:*OsPFPβ* RNAi-Linien untersucht.

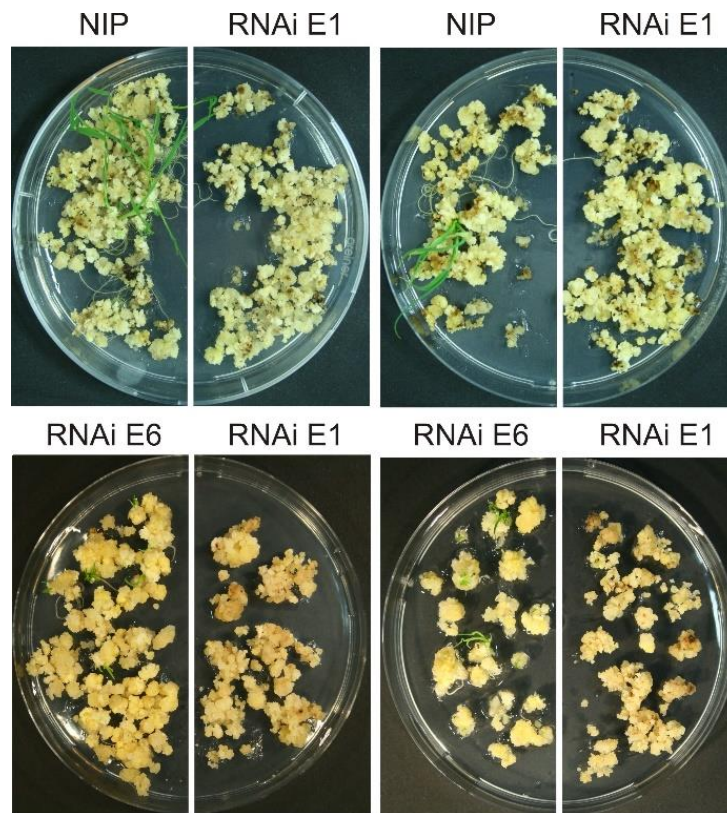


Abbildung 8: Regeneration der *OsPFPβ* RNAi-Linie E1. *Oryza sativa* ssp. Japonica cv. Nipponbare (NIP) und die zwei ausgewählten *OsPFPβ* RNAi-Linien E1 und E6 wurden für 6 Wochen auf REIII-Spross-Regenerationsmedium ohne Selektionsmarker kultiviert.

Initial wurden bei der Transformation von pH7GWIWG2,0:*OsPFPβ* in *Oryza sativa* ssp. Japonica cv. Nipponbare fünf verschiedene gegen Hygromycin B resistente Kalluslinien selektiert; Hygromycin B ist das auf dem transformierten Vektor kodierte Antibiotikum, das zum Selektieren verwendet wurde. Alle Linien wurden anfänglich auf Spross-Regenerationsmedium transferiert. Hierbei konnte die RNAi-Linie E1 identifiziert werden, die nicht in der Lage war, Sprossgewebe zu regenerieren. Zum Vergleich wurden deshalb die RNAi-Linie E1 und E6 sowie der *Oryza sativa* ssp. Japonica cv. Nipponbare Wildtyp parallel ohne Selektionsmarker auf Spross-Regenerationsmedium angezogen (Abbildung 8). Die RNAi-Linie E6 wurde aus einer der vier zur Sprossregeneration fähigen Linien zu dem damaligen Zeitpunkt zufällig ausgewählt. Bei der *OsPFPβ* RNAi-Linie E1 konnte im Vergleich zum Wildtyp oder der RNAi-Linie E6 auf Regenerationsmedium keine Induktion von Sprosswachstum beobachtet werden.

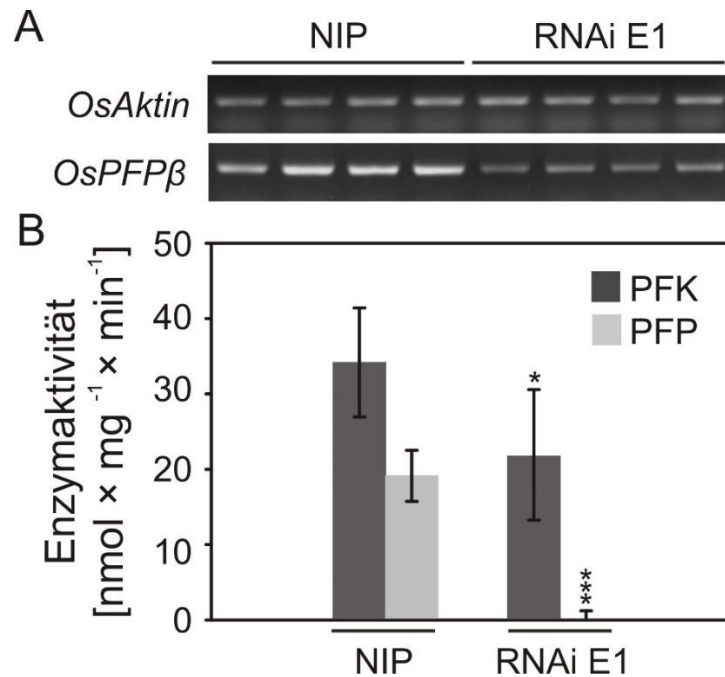


Abbildung 9: Expressionsanalyse und PFP/PFK-Aktivität der OsPFPβ RNAi-Linie E1. (A) Für Expressionsanalysen wurde aus 10 Tage altem Kallusgewebe von *Oryza sativa* ssp. Japonica cv. Nipponbare (NIP) und aus der RNAi-Linie E1 RNA isoliert und die *OsPFPβ*-Expression analysiert. Als Ladekontrolle diente *OsAktin*. Die amplifizierten cDNA-Fragmente wurden in einem 1 % [w/v] Agarosegel aufgetrennt und mit Serva-Stain angefärbt. (B) Für die Bestimmung der Enzymaktivität wurde aus 10 Tage altem Kallusgewebe von OsPFPβ RNAi E1 und dem Wildtyp Nipponbare (NIP) das Gesamtprotein extrahiert und die PFP/PFK-Aktivität bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD. Sternchen indizieren signifikante Unterschiede (T-Test, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, $n = 7$).

Zur weiteren Analyse wurde die *OsPFPβ*-Expression im *Oryza sativa* ssp. Japonica cv. Nipponbare Wildtyp und der RNAi-Linie E1 nachgewiesen. Die RNAi-Linie E1 wies im Vergleich zum Wildtyp eine Reduktion der *OsPFPβ*-Transkriptmenge auf (Abbildung 9 A).

Daneben verursachte die RNAi-Linie E1 im Kallusgewebe eine komplette Inhibition der PFP-Aktivität, wohingegen der Nipponbare Wildtyp eine PFP-Aktivität von $19,2 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ zeigte (Abbildung 9 B). Zur Kontrolle wurde in beiden Genotypen die PFK-Aktivität analysiert. In der RNAi-Linie E1 sowie im Wildtyp Nipponbare konnte eine PFK-Aktivität von 21,8 bzw. $34,2 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ bestimmt werden. Neben der Enzymaktivität wurde in der OsPFPβ RNAi E1 der Metabolitgehalt der primären Stoffe des Kohlenhydratmetabolismus bestimmt (Abbildung 10). Die OsPFPβ RNAi E1 akkumulierte signifikant mehr Stärke als der *Oryza sativa* ssp. Japonica cv. Nipponbare Wildtyp. Mit $3,39 \mu\text{mol} \times \text{g FW}^{-1}$ war der Stärkegehalt im Vergleich zum Wildtyp in der RNAi E1 3,5-fach erhöht (Abbildung 10 A). Fru6P ist das primäre Substrat der OsPFP-Enzymreaktion. In der RNAi E1 konnte ein signifikant höherer Gehalt dieses Stoffes ermittelt werden. Bei dem Wildtyp wurde $0,03 \mu\text{mol} \times \text{g FW}^{-1}$ Fru6P und bei der RNAi E1 $0,09 \mu\text{mol} \times \text{g FW}^{-1}$ Fru6P bestimmt, was einer Steigerung von

300 % entsprach (Abbildung 10 B). Des Weiteren konnte ein erhöhter Glucose- und Saccharosegehalt in der RNAi E1 festgestellt werden. Im Vergleich zum Wildtyp enthielt die OsPFPβ RNAi E1 signifikant 5-fach mehr Glucose und 25-fach mehr Saccharose. Während im Wildtyp nur $0,62 \mu\text{mol} \times \text{g FW}^{-1}$ Saccharose detektiert werden konnten, akkumulierte OsPFPβ RNAi E1 $15,4 \mu\text{mol} \times \text{g FW}^{-1}$ Saccharose (Abbildung 10 C). Der Glu6P-Gehalt war ebenfalls tendenziell, jedoch nicht signifikant, in der OsPFPβ RNAi E1 erhöht. Im Gegensatz dazu enthielt die RNAi E1 mit $0,03 \mu\text{mol} \times \text{g FW}^{-1}$ PEP nur noch 60 % des PEP-Gehaltes vom Wildtyp (Abbildung 10 D). Beim Pyruvat-, ATP- und ADP-Gehalt konnten keine Unterschiede zwischen den untersuchten Genotypen ermittelt werden (Abbildung 10 E).

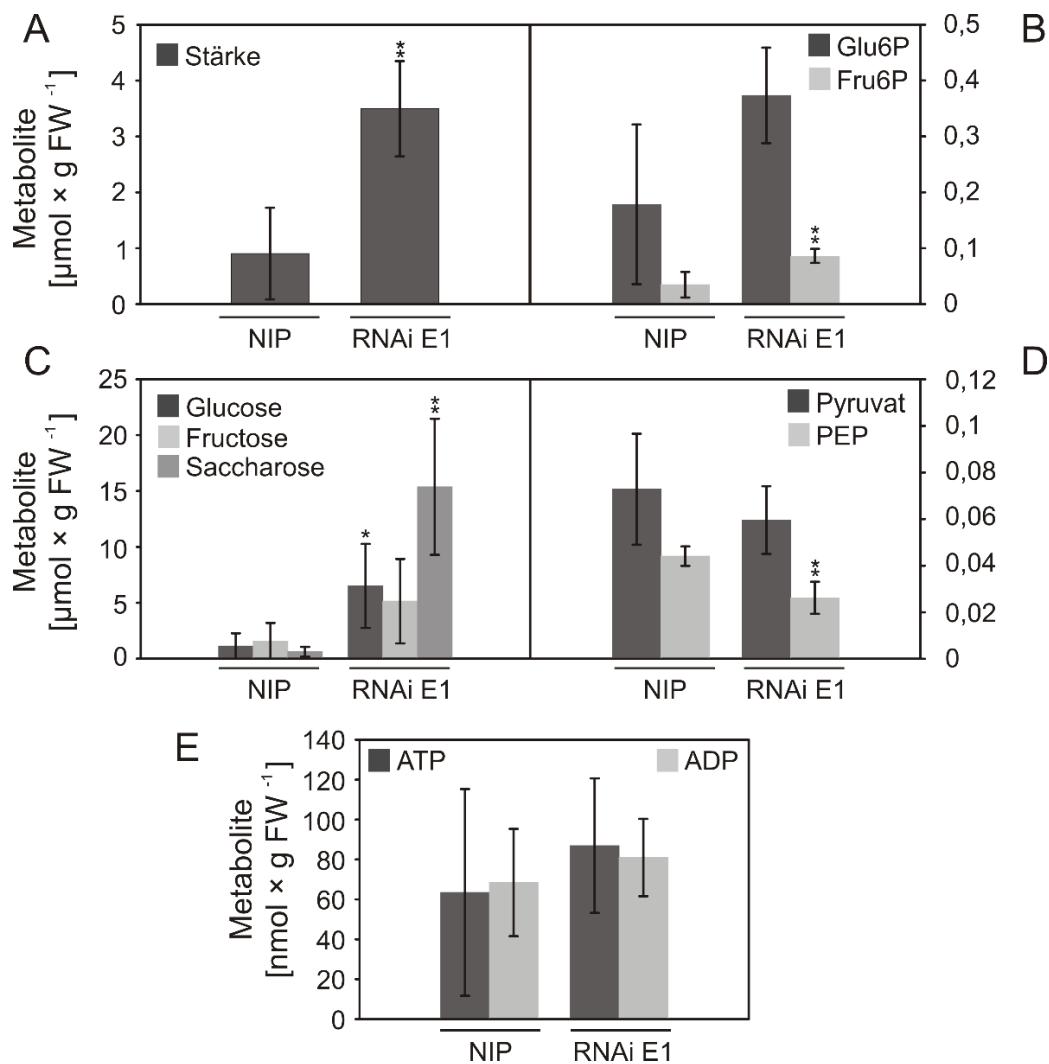


Abbildung 10: Bestimmung der Zucker-, ADP- sowie ATP-Gehalte in 10 Tage altem Kallusgewebe der OsPFPβ RNAi E1 Linie. Kallus vom *Oryza sativa* ssp. Japonica cv. Nipponbare (NIP) und der RNAi-Linie E1 wurde für 10 Tage auf Kallusinduktionsmedium angezogen, geerntet und anschließend der (A) Stärke-, (B) Glucose-6-Phosphat- (Glu6P), Fructose-6-Phosphat- (Fru6P), (C) Glucose-, Fructose-, Saccharose- (D) Pyruvat-, Phosphoenolpyruvat-Gehalt (PEP) sowie die (E) ADP- und ATP-Menge photometrisch ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Sternchen indizieren signifikante Unterschiede (T-Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, $n = 4$).

Zusammenfassend konnte bislang die homozygote *OsPFPβ* T-DNA-Insertionsmutante PFG_2D-31392.R selektiert werden, die nach 2,5 Monaten einen letalen Phänotyp zeigte. Bei Kallusgewebe dieser T-DNA-Linie sowie der *OsPFPβ* RNAi E1 konnte im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp eine komplette Verringerung der PFP-Aktivität detektiert werden. *OsPFPβ*-Transkriptmengen waren bei der RNAi E1 reduziert und bei der homozygoten T-DNA-Linie PFG_2D-31392.R nicht mehr nachweisbar. Daneben war es nicht möglich, aus dem homozygoten Kallusgewebe der T-DNA-Linie und der RNAi-Linie E1 Pflanzen zu regenerieren. Messungen von Zuckern des Kohlenhydratmetabolismus ergaben, dass der *OsPFP*-Enzymreaktion vorgelagerte Zucker wie Saccharose, Fru6P, Glucose und Stärke in der RNAi E1 im Vergleich zum Wildtyp akkumulierten. Obwohl das Kallusgewebe der T-DNA-Insertionsmutante PFG_2D-31392.R analysiert wurde, konnten die Daten aufgrund des erhöhten Alters des Kallusgewebes nicht reproduziert werden.

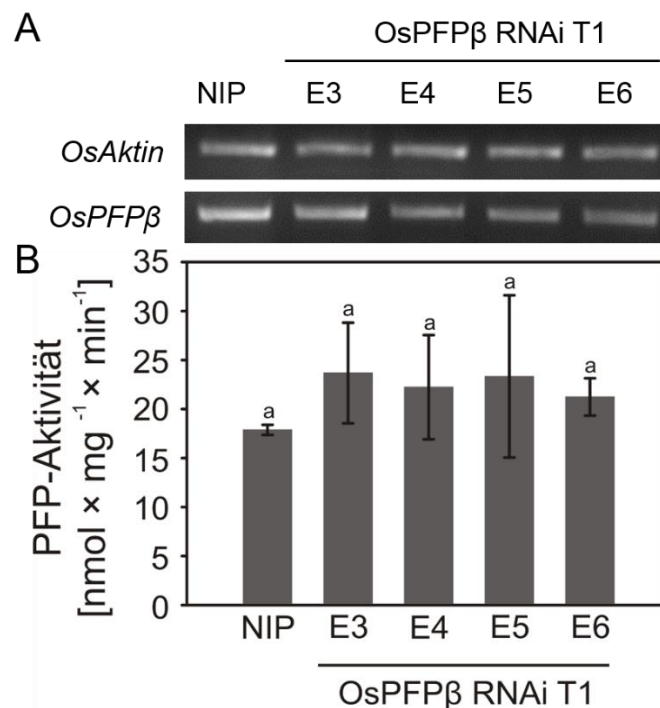


Abbildung 11: Expressionsanalyse und PFP-Aktivität der *OsPFPβ* RNAi-Linien E3 bis E6. (A) Aus 10 Tage altem Kallusgewebe wurde RNA isoliert und die *OsPFPβ*-Expression der pH7GWIWG2,0:*OsPFPβ* RNAi Linien E3 bis E6 analysiert. Als Ladekontrolle diente *OsAktin*. Die cDNA-Fragmente wurden in einem 1 % [w/v] Agarosegel aufgetrennt und mit Serva-Stain angefärbt. (B) PFP-Aktivität in adulten Pflanzen der T1-Generation der *OsPFPβ* RNAi-Linien E3 bis E6. Blattmaterial von 2 Monate alten *Oryza sativa* ssp. Japonica cv. Nipponbare (NIP) und den RNAi-Linien E3 bis E6 wurde geerntet, das Gesamtprotein extrahiert und die PFP-Aktivität gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD (n=3-4). Bei einer zugrundeliegenden Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (einfaktorielle ANOVA).

Neben der *OsPFPβ* RNAi-Linie E1 konnten während der Reistransformation von pH7GWIWG2,0:*OsPFPβ* die weiteren unabhängigen resistenten RNAi-Linien E3, E4, E5 und E6 selektiert werden. Während es nicht möglich war, aus der RNAi E1 Sprossgewebe zu regenerieren, konnten aus dem Kallusgewebe der E3, E4, E5 und E6 Pflanzen gewonnen werden. Aus Kallus dieser Linien wurde RNA isoliert und die *OsPFPβ*-Expression analysiert (Abbildung 11 A). Im Vergleich zur wildtypischen *Oryza sativa* ssp. Japonica cv. Nipponbare (NIP) konnte bei den vier untersuchten *OsPFPβ* RNAi-Linien E3, E4, E5 und E6 eine leichte Reduktion der *OsPFPβ*-Expression beobachtet werden. In eins bis drei unabhängigen Experimenten wurde die PFP-Aktivität der vier RNAi-Linien ermittelt, dabei konnte im Kallusgewebe der RNAi-Linien E3, E4, E5 und E6 eine geringe Reduktion der PFP-Aktivität im Vergleich zum Nipponbare Wildtyp ermittelt werden (Anhang, Abbildung 40). Anschließend wurde die PFP-Aktivität in Blättern von regenerierten, zwei Monate alten, adulten Pflanzen bestimmt (Abbildung 11 B). Die vier untersuchten RNAi-Linien E3, E4, E5 und E6 verursachten im Vergleich zu Nipponbare Wildtyp keine signifikante Verringerung der PFP-Aktivität.

3.4 Analyse der *OsPFPβ* RNAi-Linien in jungen und adulten Pflanzen der T2-Generation

Die bislang analysierten RNAi-Linien der T1-Generation E3, E4, E5 und E6 verursachten im Kallusgewebe reduzierte *OsPFPβ*-Expression und PFP-Aktivität, wohingegen die Blätter adulter Pflanzen sich in ihrer PFP-Aktivität nicht vom *Oryza sativa* ssp. Japonica cv. Nipponbare Wildtyp unterschieden. Aus diesem Grund wurden 44 Pflanzen der T2-Generation der *OsPFPβ* RNAi E3, E5 und E6 angezogen und analysiert. Die RNAi-Linie E4 wurde nicht verwendet, da nicht genügend Samen von dieser Linie zur Verfügung standen. Zuerst wurde in 21 Tage-alten Pflanzen der T2-Generation die PFP-Aktivität vermessen. (Anhang, Abbildung 42). Basierend darauf wurden, soweit möglich, von jeder verwendeten Linie der T1-Generation für weitere Untersuchungen Nachkommen ausgewählt, die eine reduzierte (E3-12, E3-18; E6-9, E6-10), eine erhöhte (E3-25, E6-7) und die gleiche (E5-3; E5-7) PFP-Aktivität wie der Nipponbare Wildtyp aufwiesen (Abbildung 12 B). Korrespondierend dazu wurde die RNA aus den ausgewählten Pflanzen E3-12, E3-18, E3-25, E5-3; E5-7, E6-7, E6-9, E6-10 und den *Oryza sativa* ssp. Japonica cv. Nipponbare Wildtyp isoliert und die *OsPFPβ*-Expression ermittelt (Abbildung 12 A). Bis auf die RNAi-Linie E3-25, die eine deutlich höhere Expression als der Wildtyp aufwies, konnte bei allen anderen Linien eine geringe Reduktion der *OsPFPβ*-Expression beobachtet werden. Aus Mangel an genügend Pflanzenmaterial wurden die ausgewählten Pflanzen unter Langtagbedingungen für weitere 5 Wochen angezogen. PFP/PFK-Aktivität sowie Metabolitgehalte und ATP- und ADP-Mengen sollten in hypoxisch behandelten Blättern analysiert werden.

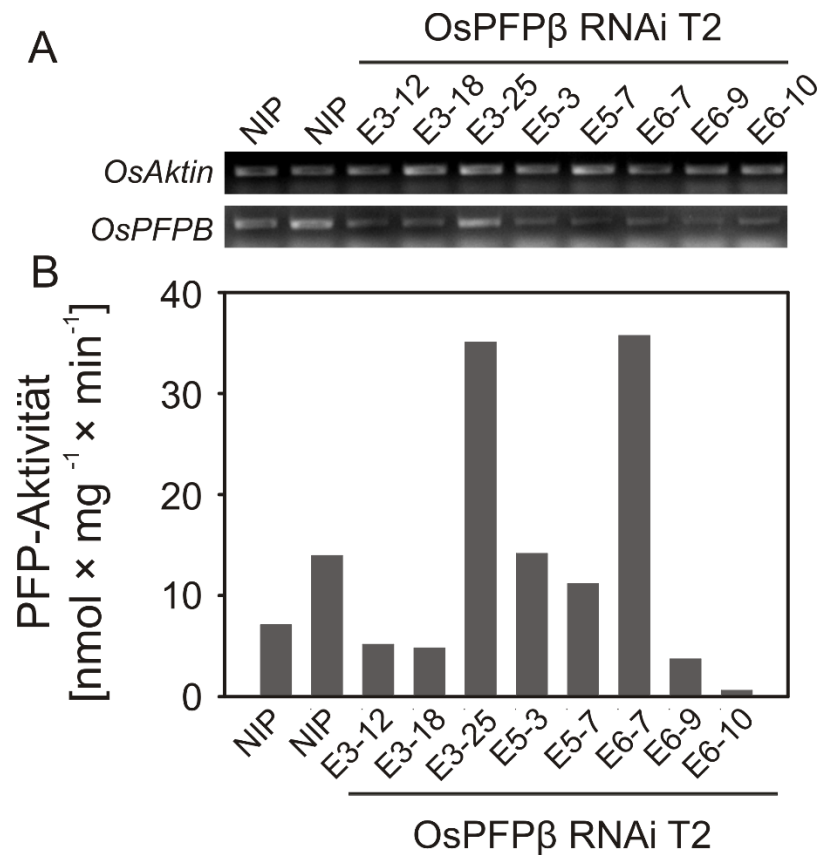


Abbildung 12: Expressionsanalyse und PFP-Aktivität ausgewählter OsPFPβ RNAi-Linien der T2-Generation. (A) Aus 21 Tage alten Pflanzen der OsPFPβ RNAi-Linien E3-12, E3-18, E3-25, E5-3, E5-7, E6-9 und E6-10 und dem Wildtyp *Oryza sativa* ssp. Japonica cv. Nipponbare (NIP) wurde RNA isoliert und die *OsPFPβ*-Expression ermittelt. Als Ladekontrolle diente *OsAktin*. Die cDNA-Fragmente wurden in einem 1 % [w/v] Agarosegel aufgetrennt und mit Serva-Stain angefärbt. (B) Dargestellt ist die PFP-Aktivität aus 21 Tage alten Pflanzen der OsPFPβ RNAi-Linien E3-12, E3-18, E3-25, E5-3; E5-7, E6-7, E6-9, E6-10 und dem Nipponbare Wildtyp (NIP) (n=1).

Zur Etablierung der Sauerstoffmangelbehandlung wurden ganze Blätter von 2 Monate alten Nipponbare Reis-Pflanzen für 24 Stunden im Exsikkator mit Stickstoff begast. Dabei befand sich die Basis der Blätter in Wasser, durch welches Stickstoff geleitet wurde. Als Kontrolle wurde Luft mit normalem Sauerstoffgehalt verwendet. Die Aktivität und Expression der ADH wird in zahlreichen Spezies unter hypoxischen Bedingungen induziert. Deshalb ist die ADH ein ausgezeichneter physiologischer und genetischer Marker für Sauerstoffmangel (Dolferus et al., 1997). Zur Überprüfung des Systems wurde aus diesem Grund die ADH-Aktivität in den Sauerstoffmangel behandelten Reisblättern bestimmt. Bei Blättern, die mit Sauerstoff begast wurden, konnte eine ADH-Aktivität von 109 nmol × mg⁻¹ × min⁻¹ ermittelt werden (Abbildung 13 A). Bei den mit Stickstoff begasten Blättern wurde eine ADH-Aktivität von 750 nmol × mg⁻¹ × min⁻¹ und damit eine 6,9-fache Induktion der Aktivität nachgewiesen. Zusätzlich dazu wurde die PFP-Aktivität dieser Proben bestimmt. Im Durchschnitt konnte unter Kontroll- und hypoxischen Bedingungen eine PFP-Aktivität von 21,8 nmol × mg⁻¹ × min⁻¹ detektiert

werden.

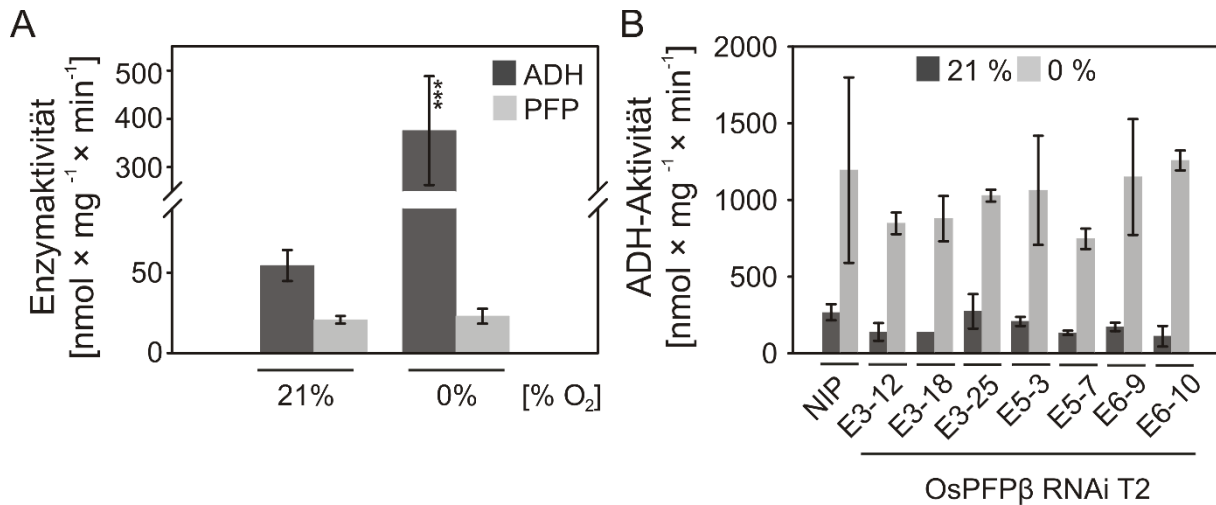


Abbildung 13: ADH- und PFP-Aktivität in adulten Sauerstoffmangel behandelten *Oryza sativa* ssp. Japonica cv. Nipponbare Wildtyp (NIP)-Blättern. (A) Blätter von 2 Monate alten adulten Reis-Pflanzen wurden für 24 unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht) Stunden mit Stickstoff behandelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede (T-Test, *** $p < 0,001$, $n=6-7$). (B) ADH-Aktivität der Sauerstoffmangel behandelten OsPFPβ RNAi-Linien E3-12, E3-18, E3-25, E5-3; E5-7, E6-7, E6-9, E6-10 und dem Wildtyp (NIP). Blätter von 8 Wochen alten Pflanzen wurden für 24 Stunden mit Stickstoff begast. Dargestellt sind Mittelwerte der ADH-Aktivität ($n=1-2$).

Blätter von 8 Wochen alten Pflanzen der OsPFPβ RNAi-Linien E3-12, E3-18, E3-25, E5-3, E5-7, E6-9 und E6-10 und des *Oryza sativa* ssp. Japonica cv. Nipponbare (NIP) Wildtyps wurden geerntet und im Exsikkator für 24 Stunden unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht) mit Stickstoff bzw. Sauerstoff begast. Die ADH-Aktivität der normoxisch behandelten Reis-Pflanzen schwankte zwischen 111 und 273 $\text{nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$, während sie bei den mit Sauerstoffmangel behandelten Pflanzen im Durchschnitt um das 6,2-fache induziert war (Abbildung 13 B). Anschließend wurde die PFK/PFP-Aktivität dieser Proben ermittelt. Die PFK-Aktivität variierte unabhängig vom Genotyp bzw. Behandlung zwischen 17,8 und 30,5 $\text{nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. Mit schwankenden PFP-Aktivitäten von minimal 10,7 bis maximal 18,9 $\text{nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ wurde sowohl unter hypoxischen als auch normoxischen Bedingungen im Vergleich zum Wildtyp bei keiner der analysierten Linien eine offensichtliche Veränderung erkennbar (Abbildung 14).

Die ATP-Mengen variierten bei allen mit Sauerstoff behandelten Pflanzen zwischen 3,09 und 3,98 $\mu\text{mol} \times \text{g FW}^{-1}$, wohingegen die hypoxische Behandlung unabhängig vom Genotyp eine Verringerung der ATP-Menge von 45 % verursachte. Bei allen Genotypen und beiden Behandlungen konnte ein ADP-Gehalt zwischen 1,26 und 2,88 $\mu\text{mol} \times \text{g FW}^{-1}$ ermittelt werden.

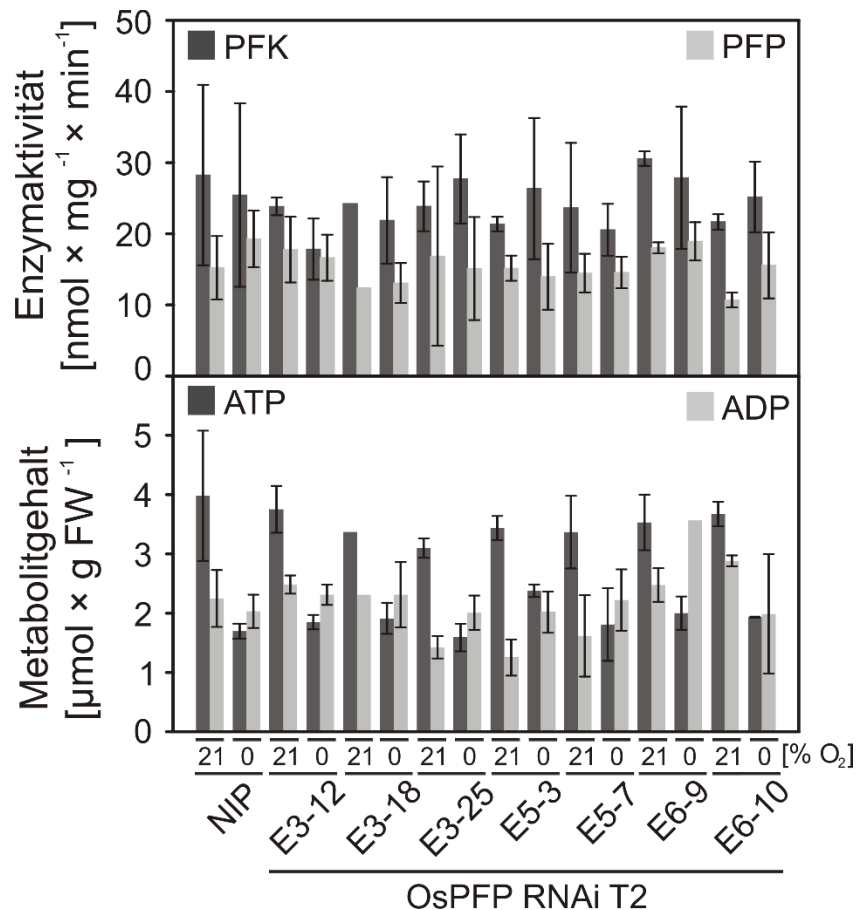


Abbildung 14: PFP/PFK-Aktivität sowie ATP- und ADP-Gehalt der Sauerstoffmangel behandelten OsPFPβ RNAi-Linien. Blätter von 8 Wochen alten *Oryza sativa* ssp. Japonica cv. Nipponbare (NIP) Wildtyp und den OsPFPβ RNAi-Linien E3-12, E3-18, E3-25, E5-3, E5-7, E6-9 und E6-10 wurden für 24 Stunden mit Stickstoff begast und der ATP- und ADP-Gehalt sowie die PFP/PFK-Aktivität photometrisch ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte (n=1-2).

Da die Pflanzen nach 8 Wochen Wachstum in den meisten Fällen nur genügend Blattmaterial für 2 Proben je Behandlung und Linie hatten (E3-12 plus Sauerstoff nur eine Probe), wurde bei der Bestimmung der PFP/PFK-Aktivitäten und ATP/ADP-Gehalte keine statistische Analyse durchgeführt. Somit konnten nur bedingt Aussagen zu etwaig vorhandenen Trends getroffen werden. Abgesehen von der hypoxisch bedingten 45 %igen Verringerung des ATP-Gehaltes, die in allen Proben gemessen wurden, konnte kein augenscheinlicher Trend bei den hypoxisch behandelten OsPFPβ RNAi-Linien E3-12, E3-18, E3-25, E5-3, E5-7, E6-9 und E6-10 im Vergleich zu Nipponbare Wildtyp beobachtet werden. Da sowohl die PFP/PFK-Aktivität als auch die ATP- bzw. ADP-Gehalte in den OsPFPβ RNAi-Linien im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert waren, wurde von einer weiteren Bestimmung der Metabolitgehalte Pyruvat, PEP, Fructose, Glucose, Saccharose, Fru6P und Glu6P abschließend abgesehen.

3.5 Analyse von *Arabidopsis thaliana* PFP T-DNA-Insertionsmutanten

Im Gegensatz zu Reis ist *Arabidopsis thaliana* eine gegenüber Überflutung intolerante Pflanze. Während *Arabidopsis thaliana* nur marginal zu überflutungsbedingten morphologischen Anpassungen fähig ist (Mühlenbock et al., 2007), ist im Vergleich dazu die metabolische Adaptation bei *Arabidopsis thaliana* deutlich ausgeprägter. Die Expression wichtiger Enzyme der Fermentation wie zum Beispiel der PDC, ADH und SuSy ist bei Hypoxie erhöht, jedoch nicht die der PFP-Gene (Mustroph et al., 2009). Das *Arabidopsis thaliana*-Genom kodiert für je zwei PFP α - und β -Untereinheiten (Nielsen et al., 2004; Mustroph et al., 2013). Während die vorliegende Arbeit entstand, wurde von Lim et al. (2014) publiziert, dass Doppelmutanten der α - und β -Untereinheiten sowie eine pfp-Quadrupelmutante im Keimlingsstadium auf Salz und osmotischen Stress im Vergleich zum Wildtyp sensitiver reagierten und eine Wachstumsretardation aufwiesen (Lim et al., 2014). Die Autoren schlussfolgerten, dass die PFP bei Keimlingen von *Arabidopsis thaliana* eine wichtige Rolle bei der Anpassung an suboptimale Bedingungen wie osmotischen oder salinen Stress spielt. Daneben konnten Gupta und Kaur (2005) beschreiben, dass abiotischer Stress bei Pflanzen zu Veränderungen des Kohlenhydratmetabolismus führt. Welche Rolle die PFP bei Hypoxie und Überflutung im Kohlenhydratmetabolismus von *Arabidopsis thaliana* spielt, ist noch weitestgehend unbekannt und sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

3.5.1 Aktivität und Transkriptionsanalyse der *Arabidopsis thaliana* PFP-Einzelmutanten

Um herauszufinden, ob die *Arabidopsis thaliana* (At)-PFP eine physiologische Rolle bei Überflutung spielt, wurden zuerst die T-DNA-Insertionsmutanten der zwei α - und β -Untereinheiten charakterisiert. Es konnten insgesamt die 6 PFP-Mutanten *pfp α 1-1* (Salk_056908C), *pfp α 1-2* (Salk_128975C), *pfp α 2-2* (GK-865E04), *pfp β 1-1* (Salk_111562), *pfp β 2-1* (Salk_025504) und *pfp β 2-2* (Salk_008847) identifiziert werden. Die beiden Gene der α -Untereinheit kodieren für 19 bzw. 18 Exons, wogegen die beiden Gene der β -Untereinheit je 16 Exons enthalten. Besonders die Gene der α -Untereinheit weisen eine deutlich übereinstimmende Exon- und Intron-Verteilung auf und sind in ihrer Genstruktur stark konserviert. Bis auf *pfp β 2-2* (Salk_008847) sind alle T-DNA-Insertionen in Exons lokalisiert (Abbildung 15 A). Aus Pflanzen, die als homozygot für die jeweilige T-DNA identifiziert werden konnten, wurde RNA isoliert und die AtPFP-Expression analysiert (Abbildung 15 B). Für die *pfp α 1-1* und die *pfp α 1-2* Mutante wurde im Vergleich zum Col-0 Wildtyp eine deutliche Reduktion der spezifischen PFP α 1-Transkriptmenge detektiert. Da dennoch eine geringe

Transkriptmenge amplifiziert werden konnte, erfolgte bei der *pfpa1-1* und *pfpa1-2* Mutante lediglich eine partielle Deletion (*knock down*) des *PFPa1*-Zielgens. Im Gegensatz dazu war das spezifische Transkript für die *pfpa2-2*, *pfpβ1-1*, *pfpβ2-1* und *pfpβ2-2* nicht mehr nachweisbar (Abbildung 15 B).

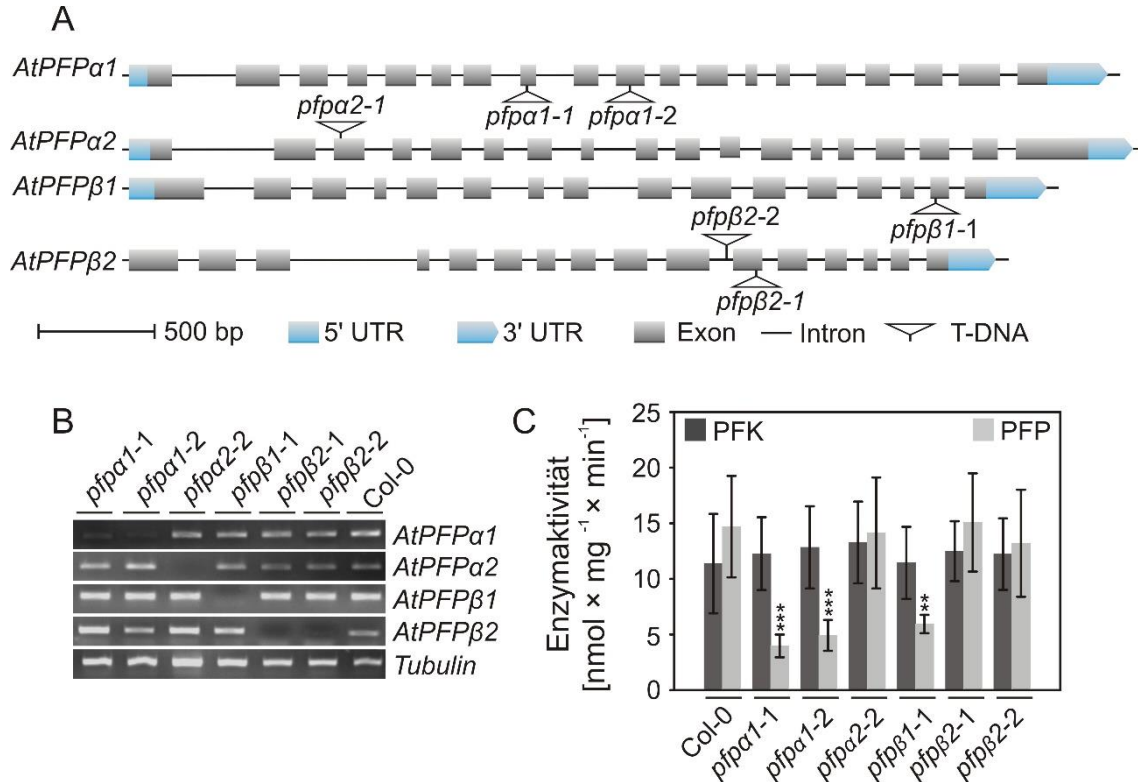


Abbildung 15: Expressionsanalysen und Enzymaktivität von *Arabidopsis thaliana* PFP T-DNA-Insertionsmutanten und dem Col-0 Wildtyp. (A) Schematisiert ist die Genstruktur der zwei α - und β -Untereinheiten von *Arabidopsis thaliana* mit Position der T-DNA-Insertionen *pfpa1-1* (Salk_056908C) *pfpa1-2* (Salk_128975C), *pfpa2-2* (GK-865E04), *pfpβ1-1* (Salk_111562), *pfpβ2-1* (Salk_025504) und *pfpβ2-2* (Salk_008847). Graue Bereiche stellen die Exons, hellblaue Bereiche die UTRs dar. Die durchgezogene schwarze Linie repräsentiert die Introns. Die Position der jeweiligen T-DNA ist mit einem schwarzen Dreieck wiedergegeben. (B) Für Expressionsanalysen wurde aus sieben Tage alten Keimlingen des Wildtyp Col-0 und aus den T-DNA-Insertionsmutanten *pfpa1-1*, *pfpa1-2*, *pfpa2-2*, *pfpβ1-1*, *pfpβ2-1*, *pfpβ2-2* RNA isoliert und die PFP-Expression analysiert. Als Ladekontrolle wurde *Tubulin* amplifiziert. Die cDNA-Fragmente wurden in einem 1 % [w/v] Agarosegel aufgetrennt und mit Serva-Stain angefärbt. (C) Analysiert wurde die PFK- und PFP-Aktivität von sieben Tage alten Keimlingen des Wildtyps Col-0 und von den T-DNA-Insertionsmutanten *pfpa1-1*, *pfpa1-2*, *pfpa2-2*, *pfpβ1-1*, *pfpβ2-1*, *pfpβ2-2*. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Sternchen indizieren signifikante Unterschiede (T-Test, * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, n=7).

Bei den zwei homozygoten Linien der α -Untereinheit *pfpa1-1* und *pfpa1-2* war die PFP-Aktivität mit 3,97 bzw. 4,92 $\text{nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ im Vergleich zu Col-0 signifikant reduziert. Die beiden *pfpa1*-Mutanten wiesen lediglich 27 bzw. 33 % der wildtypischen Col-0 PFP-Aktivität

auf (Abbildung 15 C). Die PFP-Aktivität der *pfpa2-2* war im Gegensatz dazu nicht inhibiert. Die *pfpβ1-1* verursachte mit $5,94 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ eine 60 %ige Verringerung der PFP-Aktivität, während die zwei unabhängigen Linien der *pfpβ2*-Untereinheiten im Vergleich zu Col-0 keine Veränderung bei der PFP-Aktivität zeigten.

Für den Wildtyp Col-0 konnte eine PFK-Aktivität von $11,4 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ nachgewiesen werden. Mit variierenden Aktivitäten von minimal $11,4$ bis $12,8 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ wurde bei keiner der analysierten T-DNA-Insertionsmutanten *pfpa1-1*, *pfpa1-2*, *pfpa2-2*, *pfpβ1-1*, *pfpβ2-1* und *pfpβ2-2* eine signifikante Abweichung im Vergleich zu Wildtyp bestimmt.

3.5.2 Analyse der der *Arabidopsis thaliana* PFP T-DNA-Insertionsmutanten bei Überflutung

Um zu überprüfen, ob sich die veränderte PFP-Aktivität auf den Kohlenhydratmetabolismus oder auf die Fitness der T-DNA-Insertionsmutanten auswirkt, wurden der Gehalt ausgewählter löslicher Zucker und die Überlebensrate bei Überflutung ermittelt. Die T-DNA-Insertionsmutanten *pfpa1-1*, *pfpa1-2*, *pfpa2-2*, *pfpβ1-1*, *pfpβ2-1*, *pfpβ2-2* und der Col-0 Wildtyp wurden für 24 und 48 Stunden komplett überflutet und der Gehalt von Pyruvat, PEP, Fructose, Glucose, Saccharose, Fru6P und Glu6P gemessen.

Die Pyruvat- und PEP-Gehalte der untersuchten Pflanzen betrugen nach 24 und 48 Stunden Überflutung im Durchschnitt $0,15 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{g FW}^{-1}$ bzw. $0,10 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{g FW}^{-1}$, wichen jedoch nicht von den Werten des Col-0 Wildtyps ab (Abbildung 16). Glu6P und Fru6P sind die unmittelbaren Substrate der PFP-Enzymreaktion. Der Glu6P- bzw. Fru6P-Gehalt betrug nach 24 Stunden Überflutung bei allen getesteten Pflanzen im Durchschnitt $0,14 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{g FW}^{-1}$ bzw. $0,05 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{g FW}^{-1}$ und veränderte sich nach 48 Stunden Überflutung bei allen Genotypen nicht signifikant. Es konnte kein Unterschied zum Wildtyp ermittelt werden. Unabhängig vom Genotyp bzw. von der Behandlungsdauer schwankte der Glucosegehalt zwischen $1,53$ und $0,70 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{g FW}^{-1}$. Der Fructosegehalt variierte bei beiden Zeitpunkten und allen Genotypen zwischen $1,05$ und $0,65 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{g FW}^{-1}$. Beim Col-0 Wildtyp und den untersuchten T-DNA-Insertionslinien *pfpa1-1*, *pfpa1-2*, *pfpa2-2*, *pfpβ1-1*, *pfpβ2-1*, *pfpβ2-2* wurde nach beiden Zeitpunkten ein durchschnittlicher Saccharosegehalt von $0,59 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{g FW}^{-1}$ bestimmt. Bei einer zugrundeliegenden Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (Abbildung 16).

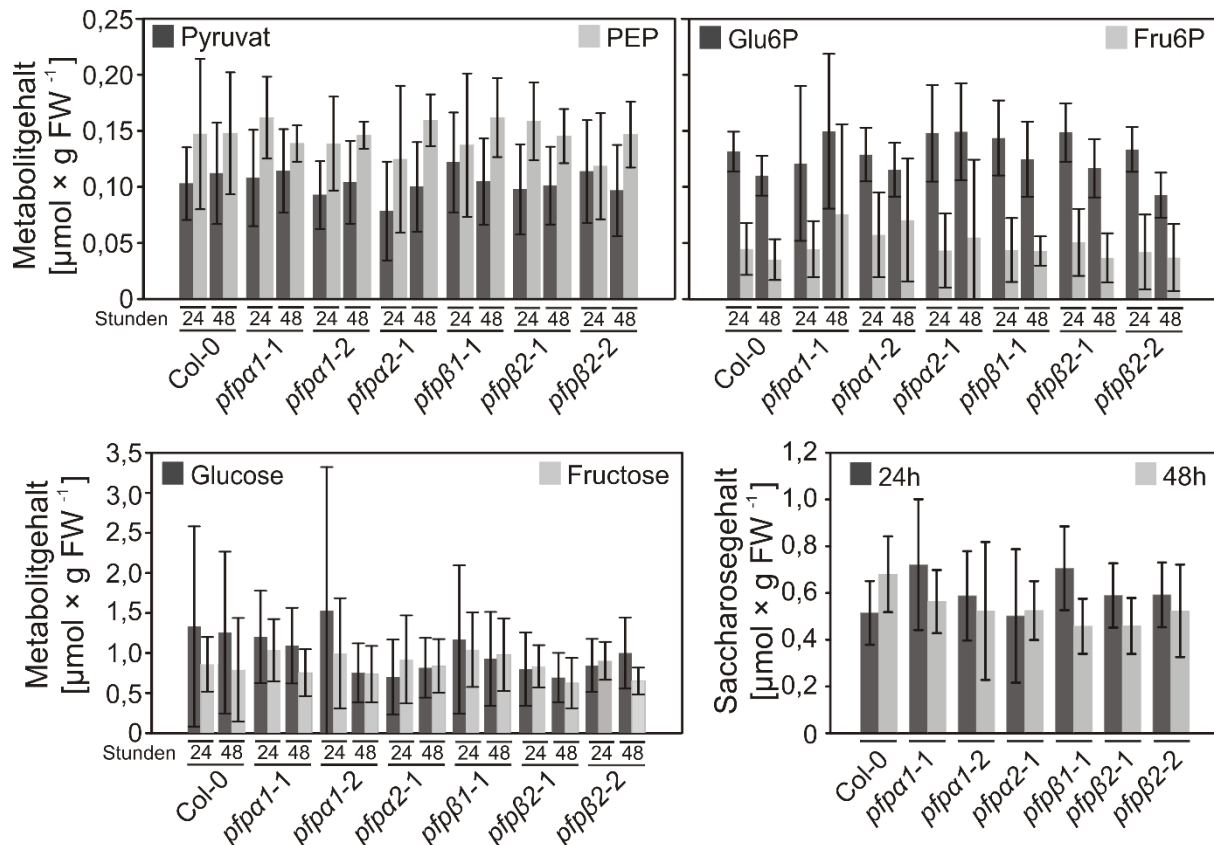


Abbildung 16: Bestimmung der Metabolitgehalte von *Arabidopsis thaliana* PFP T-DNA-Insertionslinien und dem Col-0 Wildtyp. Fünf Wochen alte Pflanzen der T-DNA-Insertionsmutanten *pfp*1-1, *pfp*1-2, *pfp*2-2, *pfp*2-1, *pfp*2-2 und dem Col-0 Wildtyp wurden für 24 (24h) und 48 (48h) Stunden überflutet und anschließend wurde der Pyruvat-, Phosphoenolpyruvat- (PEP), Glucose-6-Phosphat- (Glu6P), Fructose-6-Phosphat- (Fru6P), Glucose-, Fructose- und Saccharosegehalt photometrisch ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD (n=8-9). Bei einer zugrundeliegenden Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. (einfaktorielle ANOVA).

Zur weiteren funktionellen Charakterisierung wurde die Überlebensrate der T-DNA-Insertionsmutanten *pfp*1-1, *pfp*1-2, *pfp*2-2, *pfp*2-1, *pfp*2-2 bei Überflutung ermittelt. Überflutung ist in der Natur ein Ereignis, das nicht ausschließlich durch Sauerstoffmangel, sondern durch eine Vielzahl von weiteren Stressfaktoren definiert wird. Um dieses Stressereignis im Labor zu imitieren, wurden die Pflanzen für 3 bzw. 4 Wochen unter Kurztagbedingungen komplett mit Leitungswasser überflutet und anschließend nach 2 Wochen Regeneration fotografiert (Abbildung 17 A und Anhang, Abbildung 41). Es wurden 4 bis 7 Pflanzen je T-DNA-Insertionsmutante und Wildtyp Col-0 verwendet und drei unabhängige biologische Experimente durchgeführt. Bei allen untersuchten Genotypen sank die Überlebensrate nach drei Wochen Überflutung auf durchschnittlich 70 % und reduzierte sich deutlich nach vierwöchiger Überflutung, dabei schwankte sie zwischen 25 und 41 %. Jedoch konnte nach drei bzw. vier Wochen Überflutung kein signifikanter Unterschied

zwischen dem Wildtyp Col-0 und den T-DNA-Insertionsmutanten *pfpa1-1*, *pfpa1-2*, *pfpa2-2*, *pfpβ1-1*, *pfpβ2-1*, *pfpβ2-2* beobachtet werden (Abbildung 17 B).

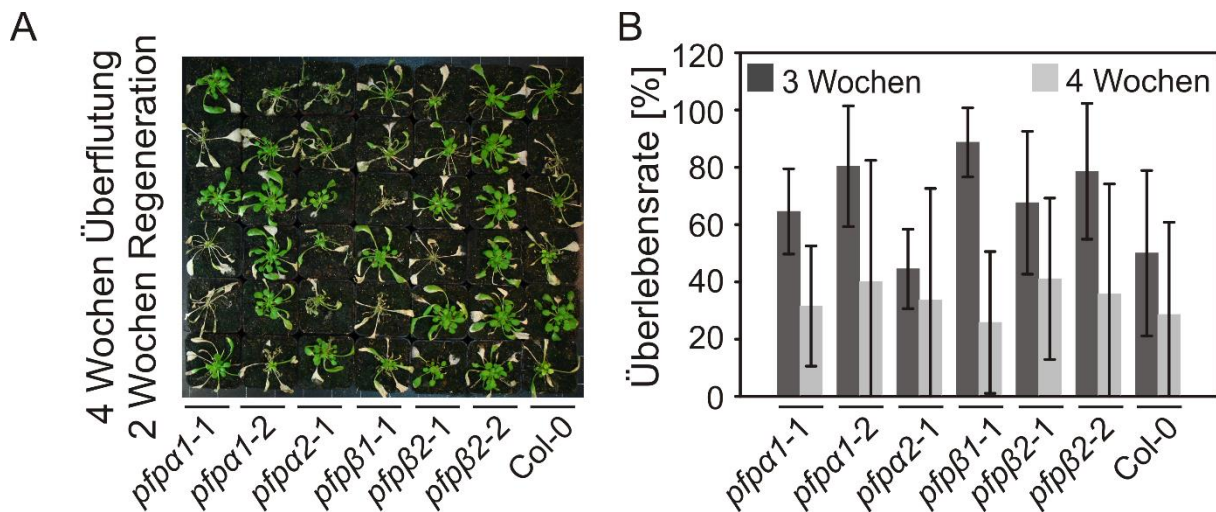


Abbildung 17: Überlebensexperiment und Überlebensrate ausgewählter *Arabidopsis thaliana* T-DNA-Insertionsmutanten und Col-0 nach 3 bzw. 4 wöchiger Überflutung. (A) Abgebildet sind Pflanzen der T-DNA-Insertionsmutanten *pfpa1-1*, *pfpa1-2*, *pfpa2-2*, *pfpβ1-1*, *pfpβ2-1*, *pfpβ2-2* und Col-0 nach vier Wochen kompletter Überflutung und 2 Wochen Regeneration (B) sowie deren Überlebensrate in Prozent [%]. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) der Überlebensrate von drei unabhängigen Experimenten (22-26 Pflanzen). Bei einer zugrundeliegenden Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (einfaktorielle ANOVA).

3.5.3 Herstellung der PFPβ und PFPα-Doppelmutanten in *Arabidopsis thaliana*

Im weiteren Verlauf wurde von der katalytischen β-Untereinheit und der regulatorischen α-Untereinheit jeweils eine Doppelmutante hergestellt. Dazu wurden die T-DNA-Insertionslinien der α-Untereinheit *pfpa1-1* (Salk_056908C) und *pfpa2-1* (GK-865E04) sowie die Linien der β-Untereinheit *pfpβ1-1* (Salk_111562) und *pfpβ2-1* (Salk_025504) gekreuzt. Die DNA der F2-Generation potentieller *pfpa1-1* × *pfpa2-1*- und *pfpβ1-1* × *pfpβ2-1*-Doppelmutanten wurde isoliert und analysiert. Bei Pflanze *pfpa-40* konnte sowohl für *AtPFPα1* und *AtPFPα2* kein spezifisches Fragment für das wildtypische Allel, jedoch für das jeweilige T-DNA-Allel amplifiziert werden (Abbildung 18 A). Die Pflanze *pfpβ-25* wies ebenfalls jeweils ein spezifisches Fragment für das T-DNA-Allel der beiden β-Untereinheiten auf, die entsprechenden DNA-Fragmente für das jeweilige WT-Allel konnte jedoch auch bei dieser Pflanze nicht festgesellt werden.

Anschließend wurde die PFK- und PFP-Aktivität der identifizierten Doppelmutanten in Keimlingen untersucht. Sowohl für die *pfpa1-1* × *pfpa2-1*- und *pfpβ1-1* × *pfpβ2-1*-Doppelmutanten als auch für den Wildtyp Col-0 konnte im Durchschnitt eine PFK-Aktivität von 19,2 nmol × mg⁻¹ min⁻¹ bestimmt werden. Die PFP-Aktivität war in den *pfpa1-1* × *pfpa2-1*- und *pfpβ1-1* × *pfpβ2-1*-Doppelmutanten mit 0,61 bzw. 0,67 nmol × mg⁻¹ min⁻¹ deutlich verringert und wies im Vergleich zum Wildtyp Col-0 mit 16,0 nmol × mg⁻¹ min⁻¹ nur noch 4% der wildtypischen PFP-Aktivität auf (Abbildung 18 B). Nach sieben Tagen Anzucht auf MS-Platten unter Kurztagbedingungen konnte im Vergleich zum Col-0 Wildtyp kein unmittelbar phänotypischer Unterschied beobachtet werden (Abbildung 18 C).

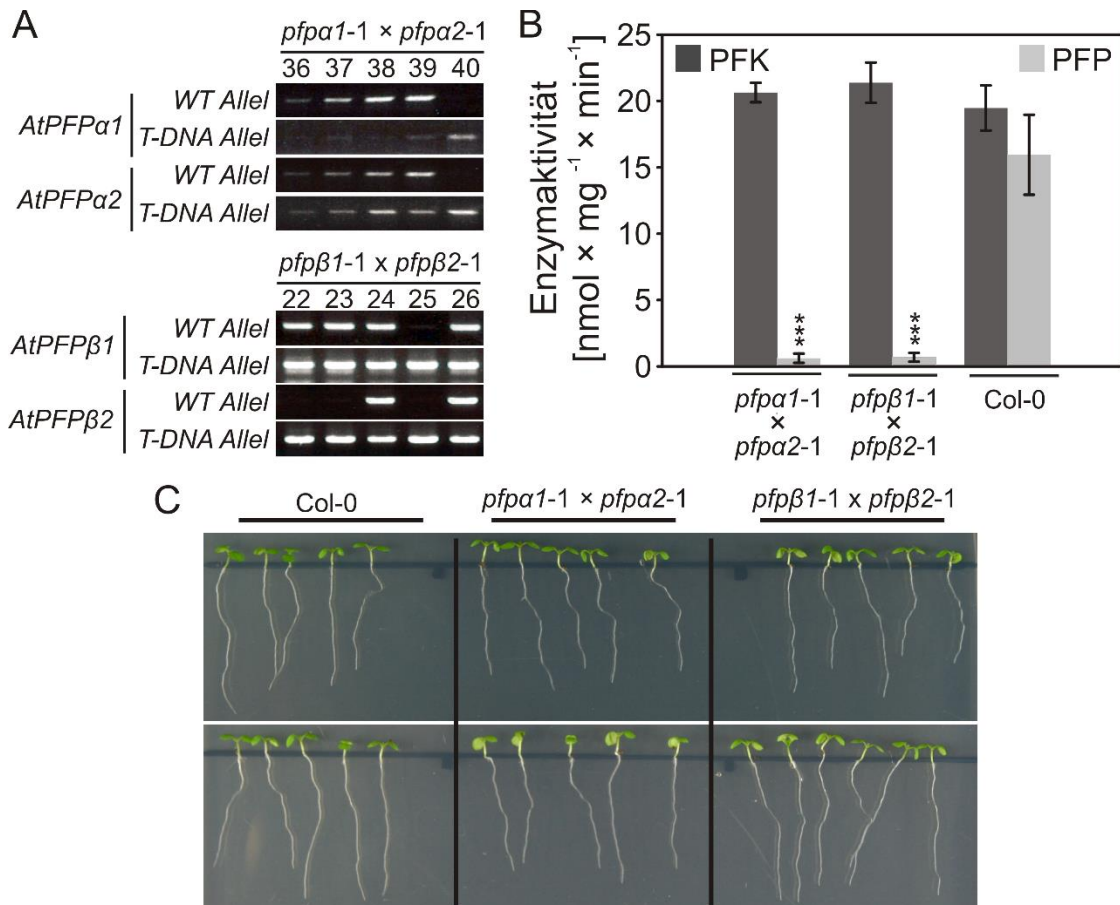


Abbildung 18: Analyse putativer Doppelmutanten der *Arabidopsis thaliana* α- und β-Untereinheiten. (A) Dargestellt sind die PCR-Fragmente, die mit den Wildtyp- und T-DNA-allelspezifischen Oligonukleotiden aus DNA ausgewählter Individuen der Kreuzung *pfpa1-1* (Salk_056908C) × *pfpa2-1* (GK-865E04) und *pfpβ1-1* (Salk_111562) × *pfpβ2-1* (Salk_025504) amplifiziert wurden. Die DNA-Fragmente wurden in einem 1 % [w/v] Agarosegel aufgetrennt und mit Serva-Stain angefärbt. (B) Analysiert wurde die PFK- und PFP-Aktivität von sieben Tage alten Keimlingen des Wildtyps Col-0 und der Kreuzungen *pfpa1-1* × *pfpa2-1* und *pfpβ1-1* × *pfpβ2-1*. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD. Sternchen indizieren signifikante Unterschiede (T-Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, $n=4$). (C) Abgebildet sind 7 Tage alte Keimlinge des Wildtyps Col-0 und der Kreuzungen *pfpa1-1* × *pfpa2-1* und *pfpβ1-1* × *pfpβ2-1*. Die Pflanzen wurden auf 1-fach MS und 1 % [w/v] Saccharose unter Kurztagbedingungen angezogen. Dargestellt sind zwei Replikate.

Zusammenfassend wurden zur funktionellen Charakterisierung der AtPFP die sechs verschiedenen T-DNA-Insertionsmutanten *pfpa1-1*, *pfpa1-2*, *pfpa2-2*, *pfpβ1-1*, *pfpβ2-1*, *pfpβ2-2* selektiert. Lediglich die homozygoten *pfpa1-1*, *pfpa1-2* und *pfpβ1-1* verursachten im Durchschnitt eine Reduktion der PFP-Aktivität um ca. 65 %. Komplette Überflutung hatte im Vergleich zum Col-0 Wildtyp bei den T-DNA-Insertionsmutanten keinen abweichenden Einfluss auf den Kohlenhydratmetabolismus oder den Phänotyp. Die Überlebensrate war bei keiner der T-DNA-Insertionsmutanten signifikant unterschiedlich. Erst die *AtPFPα*-und

AtPFPβ-Doppelmutanten zeigten eine beinahe komplette Inhibition der PFP-Aktivität. In Zukunft müssen mit diesen Linien weitere Experimente erfolgen.

3.6 Analyse der PF2K T-DNA-Insertionsmutanten

Fru2,6BP ist ein potenter Aktivator der PFP und ist zusätzlich in der Lage, die cytosolische FBPase zu inhibieren (Stitt, 1990). Obwohl die Expression des Biosyntheseeenzyms PF2K in *Arabidopsis thaliana* unter Sauerstoffmangel nicht induziert wird, konnte bei einigen anderen Pflanzen eine hypoxisch bedingte Akkumulation von Fru2,6BP beobachtet werden (Mertens et al., 1990; Kato-Noguchi und Watada, 1996). Das Reis-Genom kodiert für die zwei *PF2K*-Gene Os05g07130 und Os03g18310. Lasanthi-Kudahettige et al. (2007) analysierten die Expression von diesen Genen in anoxischen Reiskeimlingen. Aus diesen Daten geht hervor, dass sich die Expression von Os05g07130 bei Anoxie in Reiskeimlingen halbiert, während die Expression von Os03g18310 leicht erhöht ist (Lasanthi-Kudahettige et al., 2007; Patel et al., 2012).

Bereits gezeigt wurde, dass im Gegensatz zu optimalen Bedingungen PF2K-Mutanten unter wechselnden Temperatur- und Lichtbedingungen ein Wachstumsdefizit aufwiesen. McCormick und Kruger (2015) schlussfolgerten daraus, dass Fru2,6BP unter schwankenden Wachstumsbedingungen, wie sie in der Natur vorkommen, für die Optimierung der Regulation des Kohlenhydratmetabolismus essentiell ist. In dieser Arbeit sollten zwei PF2K T-DNA-Insertionsmutanten auf ihre Toleranz gegenüber Überflutung und Sauerstoffmangel untersucht werden.

Zuerst wurden zwei verschiedene T-DNA-Insertionsmutanten von PF2K identifiziert. Die T-DNA von *pf2k-1* (Salk_036916) inseriert im vorletzten Intron, wohingegen die T-DNA von *pf2k-2* (Salk_016314) in einem Exon im hinteren Drittel des Genes lokalisiert war (Abbildung 19 A). Homozygote Individuen beider Linien wurden selektiert, die RNA isoliert und das *PF2K*-Transkriptlevel beider Linien analysiert. Bei der *pf2k-2* Mutante wurde im Vergleich zum Col-0 Wildtyp eine deutliche Reduktion der spezifischen *PF2K*-Transkriptmenge festgestellt; da dennoch eine geringe Transkriptmenge amplifiziert werden konnte, erfolgte bei *pf2k-2* ein partielles Ausschalten des *PF2K*-Zielgens. Im Gegensatz dazu war das spezifische *PF2K*-Transkript bei der *pf2k-1* nicht mehr nachweisbar (Abbildung 19 B). Anschließend wurde die PFK- und PFP-Aktivität bei 7 Tage alten Keimlingen unter hypoxischen Bedingungen analysiert. Hierfür wurden die Keimlinge für 6 Stunden im Licht mit Stickstoff in einem Exsikkator begast. Im Durchschnitt wurde unabhängig von Behandlung und Genotyp eine

PFK-Aktivität von $32,4 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ und eine PFP-Aktivität von $36,7 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ gemessen. Dabei verursachte die partielle bzw. komplette Deletion des *PF2K*-Gens im Vergleich zum Wildtyp keine signifikante Veränderung der PFK- und PFP-Aktivität (Abbildung 19 C). Des Weiteren konnten nach vier Wochen Überflutung und einer Woche Regeneration bei *pf2k-1* und *pf2k-2* keine Abweichungen oder Veränderungen im Phänotyp beobachtet werden (Abbildung 19 D).

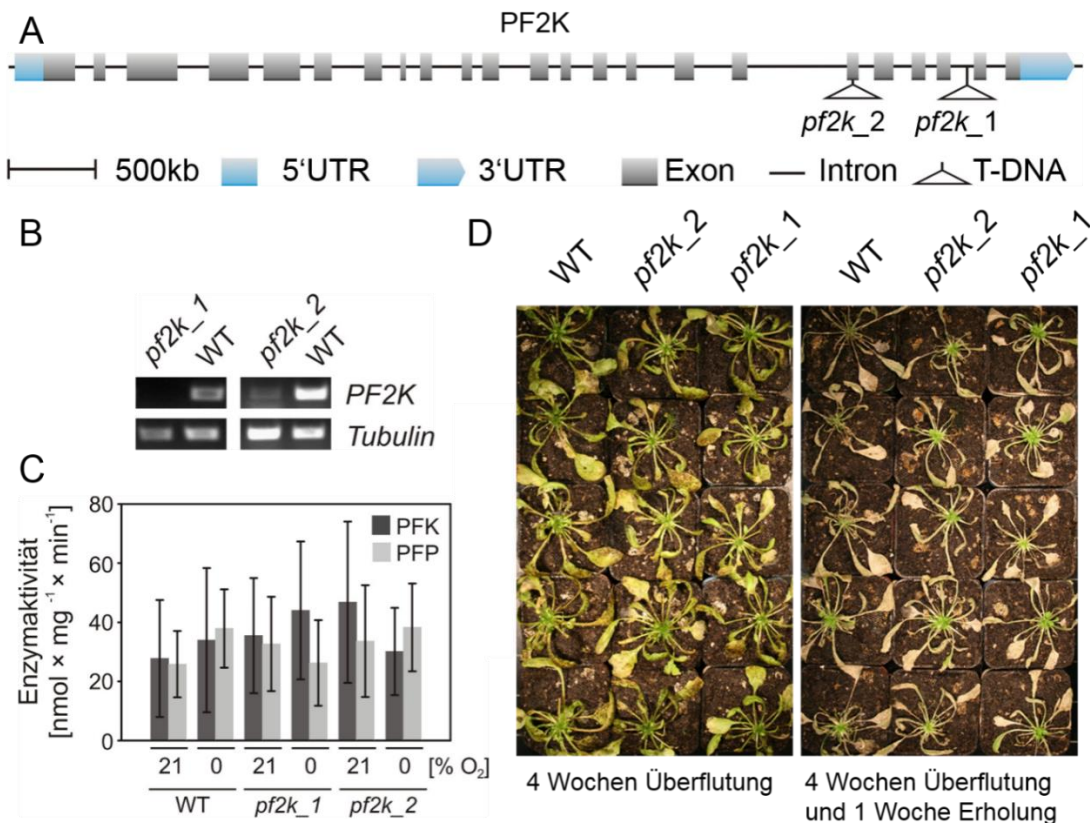


Abbildung 19: Genexpressionsanalyse und PFK/PFP-Aktivität von zwei PF2K T-DNA-Insertionsmutanten. (A) Schematisiert ist die *PF2K*-Genstruktur von *Arabidopsis thaliana* mit Position der T-DNA-Insertionen *pf2k-1* (Salk_036916) und *pf2k-2* (Salk_016314). Graue Bereiche stellen die Exons, hellblaue Bereiche die UTRs dar. Die durchgezogene schwarze Linie repräsentiert die Introns. Die Position der jeweiligen T-DNA ist mit einem schwarzen Dreieck wiedergegeben. (B) Für Expressionsanalysen wurde aus sieben Tage alten Keimlingen des Wildtyps Col-0 und der T-DNA-Insertionsmutanten *pf2k-1* und *pf2k-2* RNA isoliert und die *PF2K*-Expression analysiert. Als Ladekontrolle wurde *Tubulin* amplifiziert. Die cDNA-Fragmente wurden in einem 1 % [w/v] Agarosegel aufgetrennt und mit Serva-Stain angefärbt. (C) Analysiert wurde die PFK- und PFP-Aktivität von sieben Tage alten Keimlingen des Wildtyps Col-0 und der T-DNA-Insertionsmutanten *pf2k-1* und *pf2k-2* bei 21 % und 0 % Sauerstoff. Die Keimlinge wurden für 6 Stunden im Licht mit Stickstoff begast. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD (n=4). Bei einer zugrundeliegenden Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (einfaktorielle ANOVA). (D) 5 Wochen alte *A. thaliana* Col-0 und die zwei PF2K T-DNA-Insertionsmutanten *pf2k-1* und *pf2k-2* wurden für 4 Wochen komplett überflutet und 1 Woche regeneriert. Dargestellt sind Bilder direkt nach Überflutung und nach einer Woche Erholung.

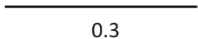
3.7 Phylogenetische Analyse der PFKs

Aufgrund der einzigartigen phylogenetischen Verteilung der PFP, die nur bei Pflanzen und einigen Mikroorganismen aufzufinden ist, fokussierten sich bisherige wissenschaftliche Studien vorwiegend auf die Charakterisierung dieses Proteins, während die PFKs bislang nur

bedingt biochemisch und molekularbiologisch beschrieben wurden. Obwohl die pflanzlichen PFKs insensitiv gegenüber Fru2,6BP sind, gibt es zahlreiche Stoffe des Kohlenhydratmetabolismus, u.a. ATP, die sich regulatorisch auf die pflanzlichen PFKs auswirken. Auch wenn bereits einige nicht pflanzliche PFK-Proteinstrukturen aufgeklärt worden sind (Paricharttanakul et al., 2005; McNae et al., 2009; Mosser et al., 2012; Kloos et al., 2014), kann über die Zusammensetzung und Proteinstruktur der pflanzlichen PFKs aufgrund ihrer starken Instabilität nur eingeschränkt Auskunft gegeben werden (Yan und Tao, 1984; Kruger und Dennis, 1987; Botha, 1991; Nielsen, 1994).

Das Ziel dieser Arbeit war, das Verständnis für die Bedeutung und Funktion der PFKs bei Sauerstoffmangel in *Arabidopsis thaliana* zu vertiefen. Funktionelle Charakterisierung sollte unter Verwendung von T-DNA-Insertionsmutanten erfolgen. Anhand des heterologen Expressionssystems in Tabak sollte die Regulation der PFKs analysiert werden.

Speziesübergreifend wurde eine phylogenetische Analyse der pflanzlichen PFKs durchgeführt. Dazu wurden PFK-Aminosäuresequenzen aus den drei dikotyledonen Pflanzen *Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula* (Schneckenklee), *Solanum lycopersicum* (Tomate), den drei monokotyledonen Pflanzen *Oryza sativa*, *Brachypodium distachyon* (Zwenke), *Sorghum bicolor* (Mohrenhirse) sowie den zwei Algenarten *Chlamydomonas reinhardtii* und *Volvox carteri* verwendet. Als Außengruppe diente die *T. brucei brucei* PFK-Aminosäuresequenz. Die Gruppe I enthielt drei plastidär lokalisierte Reis-PFK (OsPFK7, OsPFK8 und OsPFK10) sowie eine plastidische *Arabidopsis*-PFK (AtPFK5). Daneben gehörten zu dieser Gruppe jeweils drei PFKs aus *Sorghum bicolor* und *Brachypodium distachyon* sowie jeweils zwei PFKs aus *Medicago truncatula* und *Solanum lycopersicum*. Über die intrazelluläre Lokalisierung der restlich zu der Gruppe I gehörigen Proteine ist bislang nichts bekannt. Jedoch enthalten alle PFKs dieser Gruppe ein konserviertes CXXXXC-Motiv, welches in keiner der anderen Gruppen vorkam. Daneben bildeten die PFKs aus *Chlamydomonas reinhardtii* und *Volvox carteri* die Gruppe II. Die Gruppe III enthielt hauptsächlich sechs bzw. sieben cytosolische PFKs aus Reis und *Arabidopsis thaliana* (Ausnahme: AtPFK4 ist plastidär lokalisiert) sowie sieben Vertreter aus *Sorghum bicolor*, jeweils sechs Vertreter aus *Solanum lycopersicum* und *Brachypodium distachyon* und fünf Vertreter aus *Medicago truncatula*. Keine algenspezifische PFK war in der Gruppe I bzw. III vertreten (Abbildung 20).



hypoxischen Bedingungen beide Gene besonders stark in der Wurzel induziert. Im Gegensatz zur *PFK3*, die bei Hypoxie nicht in Blättern induziert ist, weist die *PFK6* auch hier analog zur *PDC1* eine erhöhte Expression auf. Aufgrund der zum großen Teil stark korrelierenden Expressionsmuster der *PDC1*, *PFK3* und der *PFK6* wurden unter Sauerstoffmangel anhand von T-DNA-Insertionsmutanten funktionelle Analysen durchgeführt.

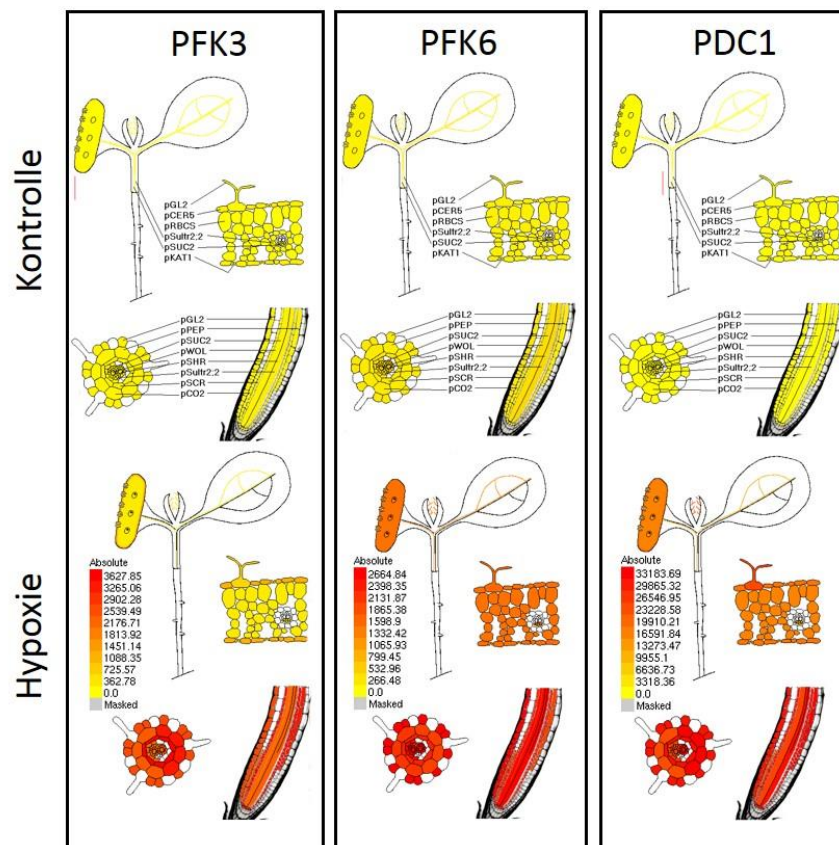


Abbildung 21: Expressionsmuster der *PFK3* (*At4g26270*), *PFK6* (*At4g32840*) und *PDC1* (*At4g33070*) unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. Dargestellt ist die absolute Expression der *PFK3*, *PFK6* und *PDC1* in verschiedenen Zelltypen (Mustroph et al., 2009).

3.8 Analyse der *Arabidopsis thaliana* PFK T-DNA-Insertionsmutanten

Zur funktionellen Analyse der *Arabidopsis thaliana* PFKs wurden zuerst T-DNA-Insertionsmutanten der einzelnen PFKs identifiziert. Homozygote Individuen der *pfk1* (Salk_011913), *pfk2* (Salk_088087), *pfk3* (Salk_125458), *pfk4* (Salk_026549), *pfk6* (Salk_048795) und *pfk7* (Salk_147551) T-DNA-Insertionsmutanten wurden isoliert. Sämtliche analysierten T-DNAs waren in die Exons der jeweiligen Gene inseriert (Abbildung 22 A). Bis auf die T-DNA der *PFK4* und *PFK6* waren alle anderen T-DNAs in der ersten Hälfte des jeweiligen Gens lokalisiert. Für die *PFK5* konnte keine T-DNA-Insertionsmutante isoliert werden.

Bis auf die *PFK2*, die aus nur zwei Exons besteht, wiesen alle restlichen *Arabidopsis thaliana* PFKs eine Anzahl von 10 bis 13 Exons auf. Während sich die Exon- und Intron-Struktur der *PFK1*, *PFK3*, *PFK4* und *PFK6* ähnelten, besaß die *PFK7* mit lediglich 10 Exons deutlich weniger Exons und korrespondierte nicht besonders stark in Struktur und Verteilung mit der *PFK1*, *PFK3*, *PFK4* und *PFK6*. Demgegenüber besaßen die *PFK5* und die *PFK2* eine deutlich veränderte Exon- und Intron-Struktur (Abbildung 22 A). Die RNA der homozygoten T-DNA-Insertionsmutanten von *pfk1* (Salk_011913), *pfk2* (Salk_088087), *pfk3* (Salk_125458), *pfk4* (Salk_026549), *pfk6* (Salk_048795) und *pfk7* (Salk_147551) wurde extrahiert und die jeweiligen Transkripte analysiert. Für keine der untersuchten homozygoten T-DNA-Insertionsmutanten konnte das jeweilige wildtypische cDNA-Fragment amplifiziert werden (Abbildung 22 B).

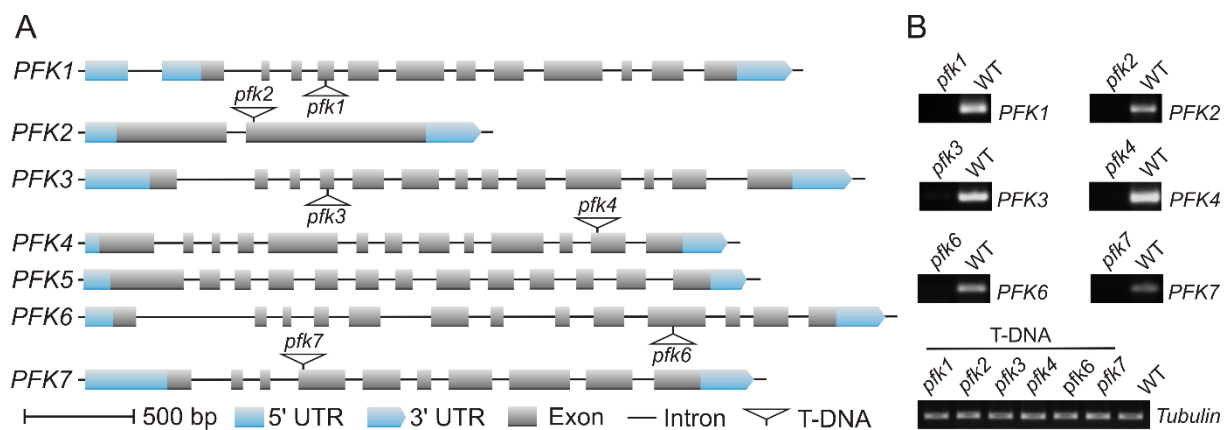


Abbildung 22: Genstruktur und Expressionsanalysen von *Arabidopsis thaliana* PFK T-DNA-Insertionsmutanten. (A) Schematisiert ist die Genstruktur der *Arabidopsis thaliana* PFKs mit Position der T-DNA-Insertion *pfk1* (Salk_011913), *pfk2* (Salk_088087), *pfk3* (Salk_125458), *pfk4* (Salk_026549), *pfk6* (Salk_048795) und *pfk7* (Salk_147551). Graue Bereiche stellen die Exons, hellblaue Bereiche die UTRs dar. Die durchgezogene schwarze Linie repräsentiert die Introns. Die Position der jeweiligen T-DNA ist mit einem schwarzen Dreieck wiedergegeben. (B) Für Expressionsanalysen wurde aus sieben Tage alten Keimlingen des Wildtyps Col-0 und der T-DNA-Insertionsmutanten *pfk1*, *pfk2*, *pfk3*, *pfk4*, *pfk6* und *pfk7* RNA isoliert und die spezifische PFK-Expression analysiert. Als Ladekontrolle wurde *Tubulin* amplifiziert. Die cDNA-Fragmente wurden in einem 1 % [w/v] Agarosegel aufgetrennt und mit Serva-Stain angefärbt.

Anschließend wurden die PFP- und PFK-Aktivität unter annähernd anoxischen Bedingungen in 7 Tage alten Keimlingen untersucht. Hierfür wurden die Keimlinge für 6 Stunden im Licht mit Stickstoff in einem Exsikkator begast. Die PFP-Aktivität schwankte bei allen T-DNA-Insertionen und dem Wildtyp Col-0 unabhängig von Behandlung zwischen 16,9 und 28,0 nmol \times mg⁻¹ \times min⁻¹ (Abbildung 23).

Die gemessenen PFK-Aktivität variierte bei *pfk1*, *pfk2*, *pfk3* und *pfk4* und dem Col-0 Wildtyp bei beiden Bedingungen zwischen 17,6 und 27,9 nmol \times mg⁻¹ \times min⁻¹. Im Durchschnitt konnte

dagegen bei *pfk6* und *pfk7* unabhängig von der Behandlung mit 18,0 und 15,8 nmol \times mg⁻¹ \times min⁻¹ eine leichte Reduktion der PFK-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp Col-0 gemessen werden. Beim Wildtyp Col-0 konnte bei diesen Messungen im Durchschnitt eine PFK-Aktivität von 21,8 nmol \times mg⁻¹ \times min⁻¹ ermittelt werden. Jedoch wurde bei der Auswertung unter Gebrauch einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ kein signifikanter Unterschied bestimmt. Bei der Reduktion der PFK-Aktivität von *pfk6* und *pfk7* handelte es sich lediglich um eine beobachtete leichte Tendenz (Abbildung 23).

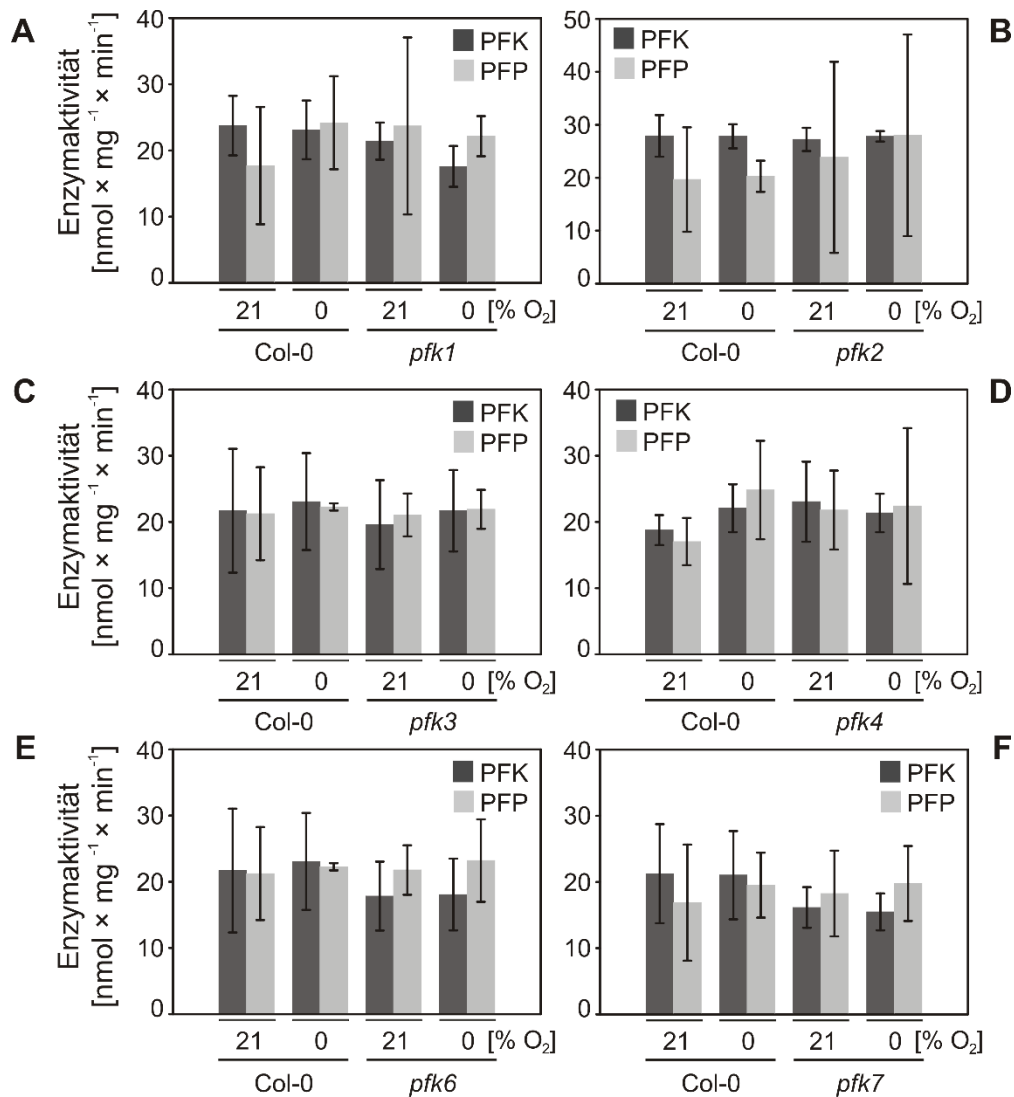


Abbildung 23: Enzymaktivität von *A. thaliana* PFK T-DNA-Insertionsmutanten und dem Wildtyp Col-0 bei Sauerstoffmangel. Analysiert wurde die PFK- und PFP-Aktivität von sieben Tage alten Keimlingen des Wildtyps Col-0 und der T-DNA-Insertionslinien (A) *pfk1* (Salk_011913), (B) *pfk2* (Salk_088087), (C) *pfk3* (Salk_125458), (D) *pfk4* (Salk_026549), (E) *pfk6* (Salk_048795) und (F) *pfk7* (Salk_147551) bei 21 % und 0 % Sauerstoff. Die Pflanzen wurden für 6 Stunden im Licht mit Stickstoff begast. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD ($n=4$). Bei einer zugrundeliegenden Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (einfaktorielle ANOVA).

Unter allen *Arabidopsis thaliana* PFKs sind die *PFK3* und die *PFK6* die einzigen Mitglieder, deren Expression bei Sauerstoffmangel induziert ist (Abbildung 21, Mustroph et al., 2013) und deren Expressionsmuster mit der *PDC1*, einem Schlüsselenzym der Sauerstoffmangelantwort, stark übereinstimmt. Da bei den *pfk3* und *pfk6* T-DNA-Insertionsmutanten unter anoxischen Bedingungen kein signifikanter Unterschied der PFK-Aktivität beobachtet werden konnte, wurden die beiden T-DNA-Insertionsmutanten *pfk3* (Salk_125458) und *pfk6* (Salk_048795) gekreuzt. Putative *pfk3* × *pfk6*-Doppelmutanten dieser Kreuzung wurden mittels PCR überprüft (Abbildung 24 A). Mehreren Individuen (6-10-3, 6-10-4, 6-10-7, 6-10-9 und 6-10-10) der T3-Generation konnten für das jeweils spezifische *PFK3* bzw. *PFK6* T-DNA-Allel positiv getestet werden. Daneben wurde bei der PCR dieser Proben kein spezifisches *PFK3* bzw. *PFK6* WT-Allel amplifiziert. Anschließend wurden die 7 Tage alten Keimlinge für 6 Stunden bei Licht mit Stickstoff begast. Im Durchschnitt konnte beim Wildtyp Col-0 unter Standard- und unter anoxischen Bedingungen eine PFK-Aktivität von $28,3 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ und bei der *pfk3* × *pfk6*-Doppelmutante eine Aktivität von $21,5 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ ermittelt werden. Obwohl dies bei der Kreuzung einer reduzierten Aktivität von 23 % gegenüber dem Wildtyp Col-0 entsprach, war dieser Unterschied nicht signifikant. Im Durchschnitt betrug die gemessenen PFP-Aktivität bei beiden Bedingungen im Wildtyp $24,3 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ und bei der *pfk3* × *pfk6*-Doppelmutante $30,8 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. Die im Wildtyp Col-0 beobachtete gegenüber der Doppelmutante um 22 % verminderte PFP-Aktivität war unter Verwendung der Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ ebenfalls nicht signifikant (Abbildung 24 B).

Anschließend wurde der Gehalt von Zuckern des Kohlenhydratmetabolismus bei Überflutung gemessen. Die homozygote *pfk3* × *pfk6*-Kreuzung und der Wildtyp Col-0 wurden für 24 bzw. 48 Stunden überflutet und der Pyruvat-, PEP-, Fructose-, Glucose-, Saccharose-, Fru6P- und Glu6P-Gehalt ermittelt. Die Pyruvat- und PEP-Gehalte der *pfk3* × *pfk6*-Kreuzung betrugen nach 24 und 48 Stunden Überflutung im Durchschnitt $0,03 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{g FW}^{-1}$ bzw. $0,02 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{g FW}^{-1}$, waren jedoch im Vergleich zum Wildtyp Col-0 nicht abweichend (Abbildung 24 C). Glu6P und Fru6P sind die unmittelbaren Substrate der PFK-Enzymreaktion. Der Glu6P-Gehalt betrug nach 24 und 48 Stunden Überflutung bei allen getesteten Pflanzen im Durchschnitt $0,14 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{g FW}^{-1}$. Der Fru6P-Gehalt variierte bei beiden Zeitpunkten und allen Genotypen zwischen $0,01$ und $0,02 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{g FW}^{-1}$ (Abbildung 24 D). Unabhängig vom Genotyp bzw. von der Behandlungsdauer schwankte der Glucosegehalt zwischen $1,55$ und $1,04 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{g FW}^{-1}$. Dagegen variierte der Fructosegehalt bei beiden Zeitpunkten unabhängig vom Genotyp zwischen $0,31$ und $0,56 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{g FW}^{-1}$ (Abbildung 24 E). Beim Wildtyp Col-0 und der *pfk3* × *pfk6*-Kreuzung wurde nach 24 bzw. 48 Stunden Überflutung ein durchschnittlicher Saccharosegehalt von $0,13 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{g FW}^{-1}$ bestimmt (Abbildung 24 F). Unter Verwendung der Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ konnte für keinen der löslichen Zucker ein signifikanter Unterschied ermittelt werden.

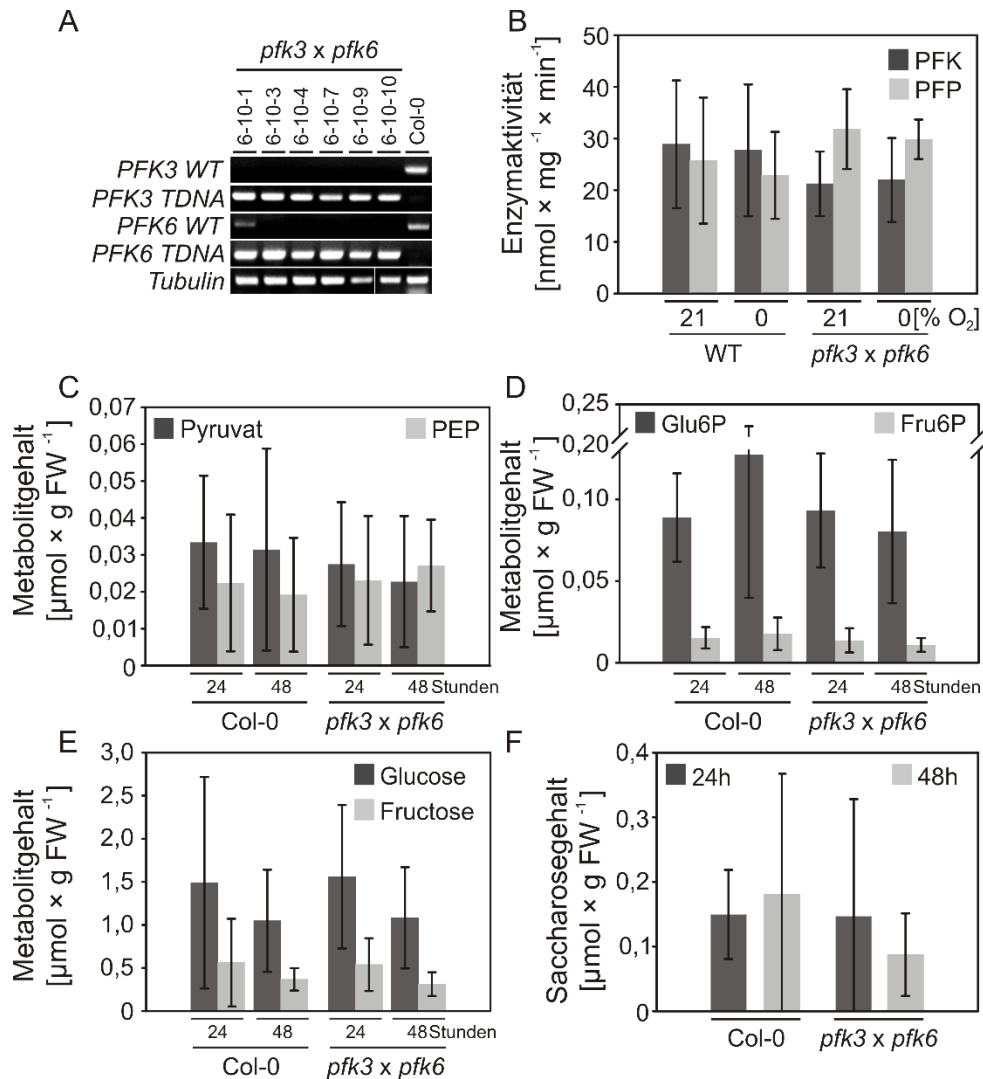


Abbildung 24: Analyse der Kreuzung von *pfk3* (Salk_125458) x *pfk6* (Salk_048795) T-DNA-Insertionsmutanten. (A) Dargestellt sind die PCR-Fragmente, die mit den wildtypspezifischen und T-DNA-allelspezifischen Oligonukleotiden aus DNA des Wildtyps Col-0 sowie putativer Individuen der *pfk3* x *pfk6*-Kreuzung amplifiziert wurden. Als Ladekontrolle wurde *Tubulin* verwendet. Die DNA-Fragmente wurden in einem 1 % [w/v] Agarosegel aufgetrennt und mit Serva-Stain angefärbt. (B) Enzymaktivität der *A. thaliana* *pfk3* x *pfk6*-Kreuzung und des Wildtyps Col-0. Analysiert wurde die PFK- und PFP-Aktivität von sieben Tage alten Keimlingen bei 21 % und 0 % Sauerstoff. Dafür wurden die Pflanzen für 6 Stunden im Licht mit Stickstoff begast. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD (n=4). (C, D, E, F) Analyse der Metabolitgehalte der *pfk3* x *pfk6*-Kreuzung und des Wildtyps Col-0. Fünf Wochen alte Pflanzen wurden für 24 (24h) und 48 (48h) Stunden komplett überflutet und anschließend der (C) Pyruvat-, PEP-, (D) Glu6P-, Fru6P-, (E) Glucose-, Fructose- und (F) Saccharosegehalt photometrisch ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD (n=3). Bei einer zugrundeliegenden Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (einfaktorielle ANOVA).

Außer für die PFK5 konnten für die 6 weiteren *Arabidopsis thaliana* PFKs mindestens eine T-DNA-Insertionsmutante identifiziert und homozygote Individuen isoliert werden. Obwohl die T-DNA-Insertionslinie Salk_067305 im *PFK5*-Gen annotiert war und bestellt wurde, konnten

keine Individuen mit dieser Insertion selektiert werden. Aus diesem Grund wurde eine konstitutiv exprimierte RNAi von PFK5 (PFK5:pH7GWIWG2,0) hergestellt und in *Arabidopsis thaliana* transformiert. Das Segregationsmuster der Samen der T2-Generation wurde auf Selektionsmedium untersucht. Anschließend wurde die RNA dieser Linien isoliert und die PFK5-Expression analysiert (Abbildung 25 A). Im Vergleich zum Wildtyp Col-0 konnte bei den AtPFK5 RNAi-Linien 1, 3, 9, 10 und 11 eine deutliche Reduktion der spezifischen PFK5-Expression beobachtet werden. Bei den AtPFK5 RNAi-Linien 2, 4, 5, 6, 7,8 und 12 war die Reduktion der PFK5-Expression nicht so stark ausgeprägt. Des Weiteren zeigten die drei AtPFK5 RNAi-Linien 1, 8 und 11 bei der Anzucht auf Hygromycin B ein Aufspaltungsmuster von 75 % Prozent langen zu 25 % kurzen Wurzeln. Mehrere Pflanzen der AtPFK5 RNAi-Linien 1, 8 und 11, die lange Wurzeln aufwiesen, wurden auf Erde überführt und bis zur Samenreife angezogen. In der T3-Generation wurden anschließend die Linien analysiert, die homozygot und somit zu 100% resistent gegenüber dem Selektionsmarker Hygromycin B waren. Dabei war die PFK-Aktivität bei den homozygoten AtPFK5 RNAi-Linien 1-1, 8-6 und 11-11 im Vergleich zum Wildtyp Col-0 um ca. 30 % signifikant reduziert (Abbildung 25 B). Zusätzlich dazu konnte bei der Untersuchung der PFK5-Expression bei den drei AtPFK5 RNAi-Linien 1-1, 8-6 und 11-11 eine verringerte PFK5-Transkriptmenge detektiert werden (Abbildung 25 C). Während der Anzucht konnte im Vergleich zum Wildtyp jedoch nach 7 Tagen auf MS-Medium kein Unterschied im Phänotyp ermittelt werden. Anschließend wurden jeweils 6 Pflanzen der AtPFK5 RNAi-Linien 1-1, 8-6 und 11-11 und des Col-0 Wildtyps auf Erde transferiert. Nach einem Monat Anzucht unter Kurztagbedingungen konnte weiterhin kein phänotypischer Unterschied zwischen Wildtyp und den AtPFK5 RNAi-Linien 1-1, 8-6 und 11-11 beobachtet werden (Anhang, Abbildung 43).

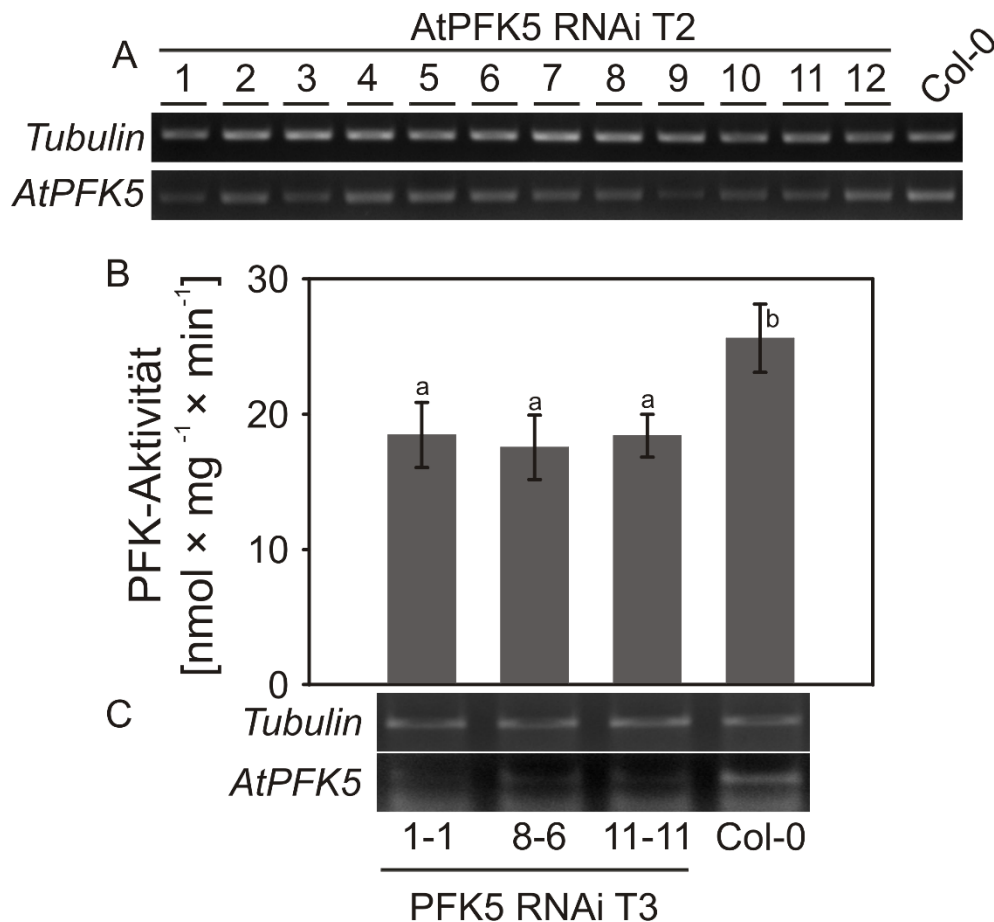


Abbildung 25 Expressionsanalysen der T2- und T3-Generation sowie PFK-Aktivität der T3-Generation ausgewählter AtPFK5 RNAi-Linien. (A) Für Expressionsanalysen wurde aus 7 Tage alten Keimlingen des Wildtyps Col-0 und der AtPFK5 RNAi-Linien der T2-Generation sowie (C) den ausgewählten homozygoten AtPFK5 RNAi-Linien 1-1, 8-6 und 11-11 der T3-Generation RNA isoliert und die *PFK5*-Expression analysiert. Als Ladekontrolle wurde *Tubulin* verwendet. Die cDNA-Fragmente wurden in einem 1 % [w/v] Agarosegel aufgetrennt und mit Serva-Stain angefärbt. (B) Analysiert wurde die PFK-Aktivität von 7 Tage alten Keimlingen des Wildtyps Col-0 und ausgewählter homozygoter Linien der AtPFK5 RNAi T3-Generation. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (T-Test, $p < 0,01$, $n=4$).

Zusammenfassend konnten für 6 der 7 *Arabidopsis thaliana* PFKs homozygote T-DNA-Insertionslinien identifiziert werden. Dabei tendiert die PFK-Aktivität bei *pfk6* und *pfk7* unabhängig von der Behandlung im Vergleich zum Wildtyp Col-0 zu einer leichten, jedoch nicht signifikanten Reduktion. Die zusätzlich hergestellte *pfk3* × *pfk6*-Kreuzung verursachte bei Sauerstoffmangel keinen Unterschied bei der PFK-Aktivität oder bei der Zusammensetzung der Stoffe des Kohlenhydratmetabolismus. Aus dem Mangel an einer T-DNA-Insertionslinie für die PFK5 wurden konstitutive AtPFK5 RNAi-Linien hergestellt. Eine partielle Inhibition der *PFK5*-Expression führte zu einer 30 %igen signifikanten Reduktion der PFK-Aktivität, hatte jedoch keine Auswirkungen auf den Phänotyp der AtPFK5 RNAi-Pflanzen.

3.9 Regulation der PFK5

3.9.1 Wiederherstellung der PFK5-Aktivität

Mustroph et al. (2007) zeigten, dass, wenn in Tabak konstitutiv überexprimiert, die *PFK2* und die *PFK5* keine erhöhte PFK-Aktivität im Vergleich zur leeren Vektor- und Puffer-Kontrolle aufzeigten. Eine erneute Sequenzierung dieser Gene im Expressionsvektor ergab, dass bei der *PFK5* im kodierenden Bereich eine Punktmutation vorlag. Ausgehend vom Startcodon führte der Austausch der Base Cytosin mit Guanin an Position 1597 zu einer Mutation des Proteins, dabei entstand anstatt des wildtypischen Glutamins an dieser Position eine Glutaminsäure (Q553E).

Das Glutamin ist bei allen *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* PFKs an dieser Position stark konserviert (Abbildung 26 B). Durch eine erneute Klonierung des *PFK5*-Gens in den Vektor pBinAR konnte die PFK-Aktivität wiederhergestellt werden (Abbildung 26 A). Wenn in Tabak konstitutiv überexprimiert, konnte bei der neu klonierten *PFK5* eine PFK-Aktivität von $416 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ bestimmt werden. Als Kontrolle wurden Pflanzen nur mit dem Puffer infiltriert. Um auszuschließen, dass die Proteinexpression einen Einfluss auf die PFK-Aktivität haben könnte, wurde das enzymatisch nicht aktive GFP im selben Vektor überexprimiert und in die Pflanzen als Kontrolle infiltriert. Im Vergleich zu den Kontrollen und der mutierten *PFK5*-Q553E wurde eine signifikante 13-fache Induktion der *PFK5*-Aktivität bei der neu kloniert wildtypischen (WT) *PFK5* gemessen. Bei der Überexpression der wildtypischen *PFK3* betrug die Aktivität $274 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. Die anschließende Mutation des konservierten Glutamins zur Glutaminsäure an der Aminosäureposition 448 verursachte bei der *PFK3* ebenfalls eine drastische Reduktion der *PFK3*-Aktivität. Es konnte zwischen der mutierten *PFK3*-Q448E und *PFK5*-Q553E sowie den beiden Kontrollen keine signifikante Abweichung bestimmt werden (Abbildung 26 A).

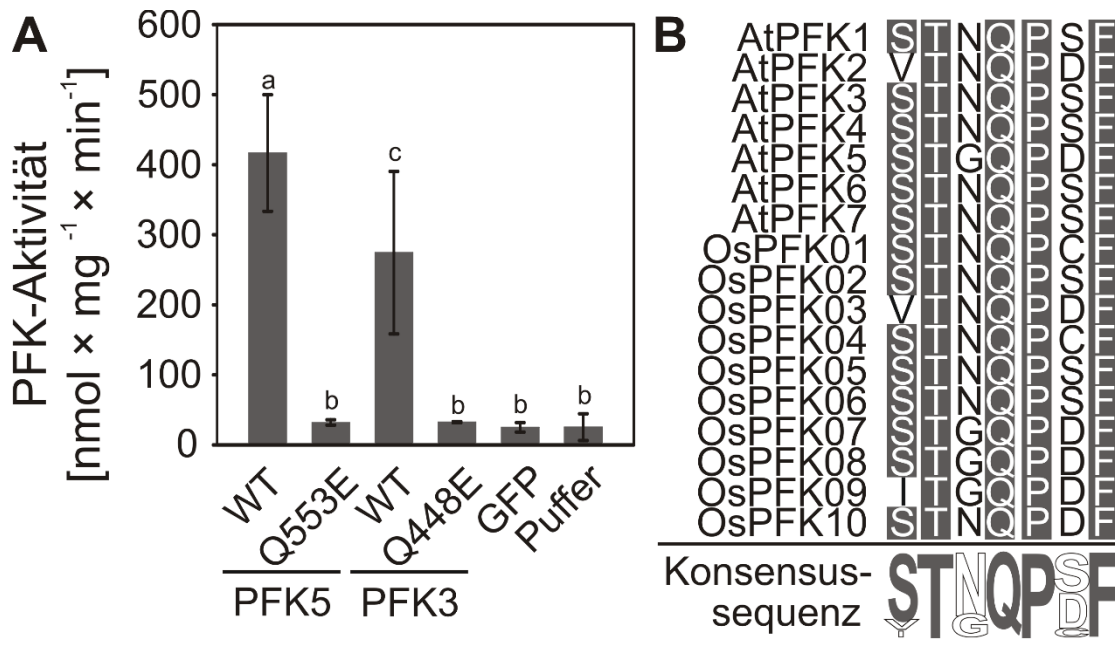


Abbildung 26: Wiederherstellung der PFK5-Aktivität. (A) PFK5 und PFK3 Wildtyp (WT) sowie Glutamin gegen Glutaminsäure Punktmutationen der PFK3 und PFK5 an Position 448 (Q448E) und 553 (Q553E) wurden in *Nicotiana benthamiana* infiltriert und überexprimiert. Nach drei Tagen wurden die Proben geerntet und unter reduzierenden Bedingungen mit β -Mercaptoethanol extrahiert. GFP und Puffer dienten als Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte (\pm SD). Buchstaben indizieren signifikante Unterschiede (Anova und Tukey-Test, $n=4$, $p < 0,05$). (B) Alignment Ausschnitt des konservierten Glutamins mit Konsensussequenz von *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa*.

3.9.2 Quantifizierung der heterolog exprimierten *Arabidopsis thaliana* PFKs

Zur besseren Quantifizierung der in Tabak heterolog exprimierten und analysierten *PFKs* sollten diese mit einer Hemagglutinin-Markierung (HA-TAG) versehen werden. Dabei wurde zuerst die PFK3 N-terminal mit einem HA-Tag fusioniert (PFK3 HA-N). Das fusionierte PFK3 HA-N Protein wurde anschließend transient in Tabak überexprimiert, die Aktivität bestimmt und das Protein über Western Blot analysiert. Die Fusionierung der PFK3 mit dem HA-Tag verursachte im Vergleich zum nativen PFK3-Protein eine signifikante Reduktion der PFK-Aktivität (Abbildung 27 B). Mit $76,9 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ war die Aktivität der PFK3-HA-N um 60 % reduziert. Über die Western Blot-Analyse konnte für die PFK3-HA-N ein spezifisches Signal der zu erwartenden Größe von ca. 55 kDa festgestellt werden (Abbildung 27 A). Da die N-terminale Kopplung des HA-Tags eine Reduktion der Proteinaktivität zu verursachen schien, wurden deshalb PFK1, PFK3, PFK6 und PFK7 C-terminal (PFK1 HA-C, PFK3 HA-C, PFK6 HA-C und PFK7 HA-C) mit einem HA-Tag fusioniert und in Tabak überexprimiert. Die Aktivität sowie die Proteinexpression wurden über Western Blot und die Genexpression über RT-PCR analysiert (Abbildung 27 C, D, E).

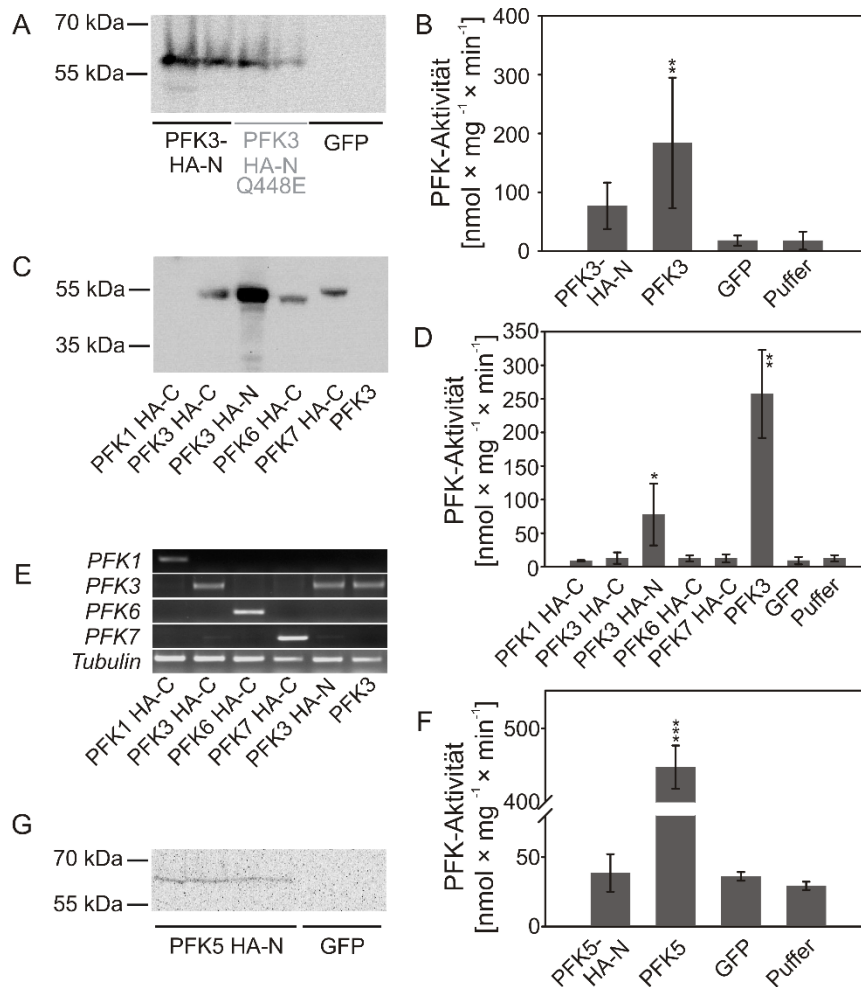


Abbildung 27: Proteindetektion, Expressionsanalyse und PFK-Aktivität von ausgewählten HA getaggtten PFKs. Ausgewählte Konstrukte wurden in *N. benthamiana* infiltriert und überexprimiert. Nach drei Tagen wurden die Proben geerntet und analysiert. (A) Dargestellt ist die Western Blot-Analyse von PFK3 N-terminal mit einem Tag fusioniert (PFK3 HA-N) sowie GFP als negative Kontrolle. (B) PFK-Aktivität der nativen PFK3, PFK3 HA-N sowie GFP und Puffer als Kontrolle. (C) Western Blot Analyse der C-terminal (HA-C) mit einem HA-Tag versehenen PFK1, 3, 6 und 7. Als Kontrolle wurde die PFK3 HA-N sowie die unmarkierte PFK3 verwendet. (D) PFK-Aktivität der C-terminal fusionierten PFK1, 3, 6, 7 und PFK3 HA-N. Als Kontrolle wurde die unmarkierte PFK3, GFP und Puffer verwendet. (E) Expressionsanalyse der in Tabak überexprimierten C-terminal getaggtten PFK1, 3, 6 und 7 (HA-C), der PFK3 HA-N sowie der unmarkierten PFK3. Als Ladekontrolle wurde aus Tabak *Tubulin* amplifiziert. Die amplifizierten cDNA-Fragmente wurden in einem 1 % [w/v] Agarosegel aufgetrennt und mit Serva-Stain angefärbt. (F) PFK-Aktivität der N-terminal mit einem HA-Tag versehenen PFK5 (PFK5 HA-N). Als Kontrolle wurden die unmarkierte PFK5 sowie GFP und Puffer verwendet. (G) Western Blot Analyse von PFK5 HA-N und GFP als negative Kontrolle. Bei der Western Blot Analyse (A, C, G) erfolgte die chemilumineszente Detektion des HA-Tags über das Markerenzym Meerrettichperoxidase. Die Belichtungszeit betrug (A) 1 Minute (C) 20 Minuten und (G) 25 Minuten. (B, D, F). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD ($n=2-5$) der PFK-Aktivität. Sternchen indizieren signifikante Unterschiede der jeweiligen PFK zum Puffer (T-test; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Die nicht markierte native PFK3 wies eine PFK-Aktivität von $257 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ auf. Die PFK-Aktivität der PFK3-HA-N war mit $77,7 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ erneut um 70 % signifikant erniedrigt. Die C-terminal mit einem HA-Tag fusionierten PFKs wiesen im Durchschnitt eine PFK-Aktivität von $11,6 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ auf und unterscheiden sich damit nicht von der Aktivität der GFP- und Pufferkontrolle (Abbildung 27 D).

Bei der Western Blot Analyse wurde - bis auf PFK1 HA-C - bei allen anderen mit einem HA-Tag fusionierten PFKs ein Signal der zu erwartenden Größe festgestellt (PFK3 HA-N und HA-C: 55 kDa, PFK6 HA-C: 52 kDa und PFK7 HA-C: 55 kDa). Die Intensität der Signale der C-terminal HA-Tag getaggtten PFK3, 6 und 7 war jedoch deutlich schwächer als das Signal der PFK3 HA-N (Abbildung 27 C). Daneben wurde von den *PFK1 HA-C*, *PFK3 HA-C*, *PFK6 HA-C*, *PFK7 HA-C* und der *PFK3 HA-N* sowie der nativen *PFK3* eine Expressionsanalyse durchgeführt. Für *PFK1 HA-C*, *PFK3 HA-C*, *PFK6 HA-C* und *PFK7 HA-C*, *PFK3 HA-N* und die native *PFK3* konnte das korrespondierende spezifische Transkript amplifiziert werden (Abbildung 27 E). Währenddessen wurde die PFK5 N-terminal mit einem HA-Tag fusioniert (PFK5 HA-N) und in Tabak exprimiert. Mittels Western Blot Analyse konnte lediglich ein sehr schwaches, jedoch spezifisches Signal der zu erwartenden Größe von 60 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 27 G). Mit $38,6 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ verursachte die PFK5 HA-N im Vergleich zur nativen PFK5-Aktivität eine signifikante Verringerung der PFK-Aktivität um 91 % (Abbildung 27 F).

3.9.3 Redox-abhängige Regulation der heterolog exprimierten *A. thaliana*

PFKs

Vergleiche der Arabidopsis- und Reis-PFK-Aminosäuresequenzen zeigten, dass mehrere Cysteine innerhalb dieser Proteinfamilie stark konserviert waren. Aufgrund ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaft ist die Thiolgruppe von Cysteinen an vielen katalytischen Reaktionen beteiligt, fungiert als Metall-Ligand oder ist Gegenstand posttranslationaler Regulation. Reaktive Cysteine können in Abhängigkeit verschiedener Redox-Signale in unterschiedlichen Oxidationsstadien vorliegen. Bei der reversiblen Redox-abhängigen posttranslationalen Regulation werden die Cysteine von Proteinen u.a. S-nitrosyliert, S-glutathionisiert oder bilden Disulfid-Brücken. Die zwei wichtigsten an diesen Prozessen beteiligten Proteinfamilien der Oxidoreduktasen sind die Thioredoxine und Glutaredoxine (Klomsiri et al., 2011; Couturier et al., 2013). So gibt es im Stroma der Chloroplasten die Enzyme des oxidativen und reduktiven Pentosephosphatweges. Ein simultaner Ablauf dieser Reaktionen würde zum Verlust von ATP führen, denn beim reduktiven Pentosephosphatweg werden ATP und NADPH aufgewendet,

um CO₂ zu Kohlenhydraten zu reduzieren, während beim oxidativen Pentosephosphatweg durch die Oxidierung von Kohlenhydraten NADPH und CO₂ freigesetzt werden. Durch die lichtabhängige Regulation zahlreicher Enzyme dieser Stoffwechselwege wird dieser sinnlose Zyklus vermieden (Bowsher et al., 2008; Gibbs und Latzko, 2012; Hatch und Boardman, 2014). Dabei wird u.a. bei Licht die Aktivität von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, dem Startenzym des oxidativen Pentosephosphatweges, durch die Reduktion von Cysteinen mittels Thioredoxin inaktiviert (Wenderoth et al., 1997; Née et al., 2009). Dagegen werden Enzyme des reduktiven Pentosephosphatweges bei Licht durch Thioredoxin eingeschaltet (Bowsher et al., 2008; Gibbs und Latzko, 2012; Hatch und Boardman, 2014).

Die Aktivität der in Tabak überexprimierten PFKs wurde zuerst im reduzierten, dann im oxidierten und abschließend im erneut reduzierten Zustand ermittelt (Abbildung 28). Die PFK-Aktivität variierte bei den sieben in Tabak transient überexprimierten PFKs zwischen 16,76 bei PFK2 und 1164 nmol × mg⁻¹ × min⁻¹ bei PFK5. Im initial gemessenen durch das β-Mercaptoethanol (β-ME) verursachten reduzierten Zustand war bis auf PFK2 die PFK-Aktivität von PFK1, 3, 4, 5, 6 und 7 im Vergleich zu der GFP- und Pufferkontrolle signifikant erhöht. Die mit 2,5 mM Natriumtetrathionat (TT) durchgeführte Oxidierung des Enzymextraktes führte bei PFK1, 2, 3, 4, 6 und 7 zu einer kompletten Inhibition der Enzymaktivität. Bei der PFK5 konnte durch das Oxidieren des Enzymextraktes lediglich eine partielle Reduktion der Aktivität von 83 % erreicht werden. Mit 200,5 nmol × mg⁻¹ × min⁻¹ wies die oxidierte PFK5 im Vergleich zu den Kontrollen eine signifikant erhöhte Aktivität auf. Durch 5 mM Dithiothreitol (DTT) wurden die zuvor oxidierten Enzymextrakte erneut reduziert. Die erneute Reduktion verursachte bei PFK5 eine komplette und bei PFK1, 3, 4, 6 und 7 eine partielle Wiederherstellung der PFK-Aktivität (Abbildung 28).

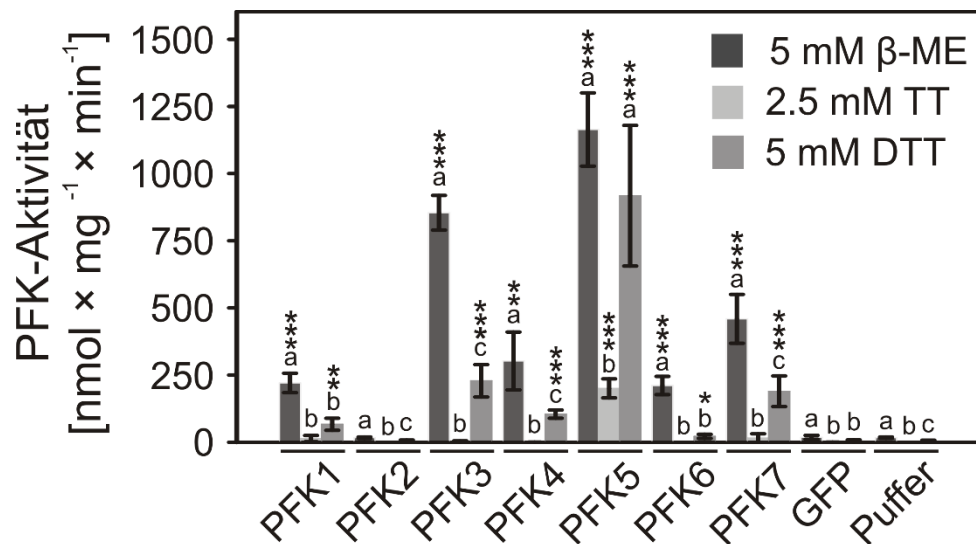


Abbildung 28: Redox-Regulation der *A. thaliana* PFKs. *A. thaliana* PFK 1-7 sowie die Kontrolle GFP und der Puffer wurde in *N. benthamiana* infiltriert. Nach drei Tagen wurden die Proben geerntet, die Proteine unter reduzierenden Bedingungen mit 5 mM β -Mercaptoethanol (β -ME) extrahiert und die PFK-Aktivität bestimmt. Anschließend wurde der Extrakt mit 2,5 mM Natriumtetrathionat (TT) oxidiert und mit 5 mM Dithiothreitol (DTT) erneut reduziert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Sternchen indizieren signifikante Unterschiede jeder Behandlung der jeweiligen PFK zum Puffer und GFP (Anova, Tukey Test; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$), wohingegen verschiedene Buchstaben Unterschiede zwischen den Behandlungen innerhalb einer PFK anzeigen (Anova, Tukey Test $p > 0,05$, $n=3$).

3.9.4 Analyse des CGG(L/I)C-Motivs von PFK3 und PFK5

Zwei in *Arabidopsis thaliana* und Reis stark konservierte Cysteine bildeten das CGG(L/I)C-Motiv. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Cysteine als CGG(L/I)C-Motiv deklariert, da es bis auf *OsPFK3* in den restlichen Arabidopsis- sowie Reis-PFKs und in der *T. brucei brucei* PFK kodiert war (Abbildung 29 C). Basierend auf sequenzvergleichenden Analysen ist die *T. brucei brucei* PFK die am nächsten verwandte PFK eines nicht pflanzlichen eukaryotischen Organismus, deren Struktur bereits kristallisiert und aufgeklärt wurde. Aus diesem Grund wurde zuerst direkt aus *T. brucei brucei* Protein extrahiert und die PFK-Aktivität unter reduzierenden und oxidierenden Bedingungen ermittelt; hierfür wurden die Extrakte mit 2,5 mM Natriumtetrathionat oxidiert und erneut mit 5 mM DTT reduziert (Abbildung 29 A). Initial wies *T. brucei brucei* eine PFK-Aktivität von $14,5 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ auf. Die Oxidierung des Extraktes verursachte eine Verringerung der Aktivität auf $2,60 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$, dies entsprach einer Reduktion von 82 %. Durch die erneute Reduktion mit 5 mM DTT erfolgte eine partielle Wiederherstellung der PFK-Aktivität auf 57 % der initial ermittelten Aktivität. Als Kontrolle wurde die *T. brucei brucei* PFK darauffolgend in den Vektor pBinAR kloniert und zur Überexpression in Tabak infiltriert. Der Expressionsvektor und die Klonierungsstrategie

korrespondierten mit dem für die *Arabidopsis thaliana* PFKs in Mustroph et al. (2007) verwendeten System. Als positive Kontrolle der Infiltration wurde die PFK5 verwendet. Hierbei konnte eine PFK-Aktivität von $805 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde bei der überexprimierten *T. brucei brucei* PFK keine signifikante Induktion der PFK-Aktivität beobachtet (Abbildung 29 B).

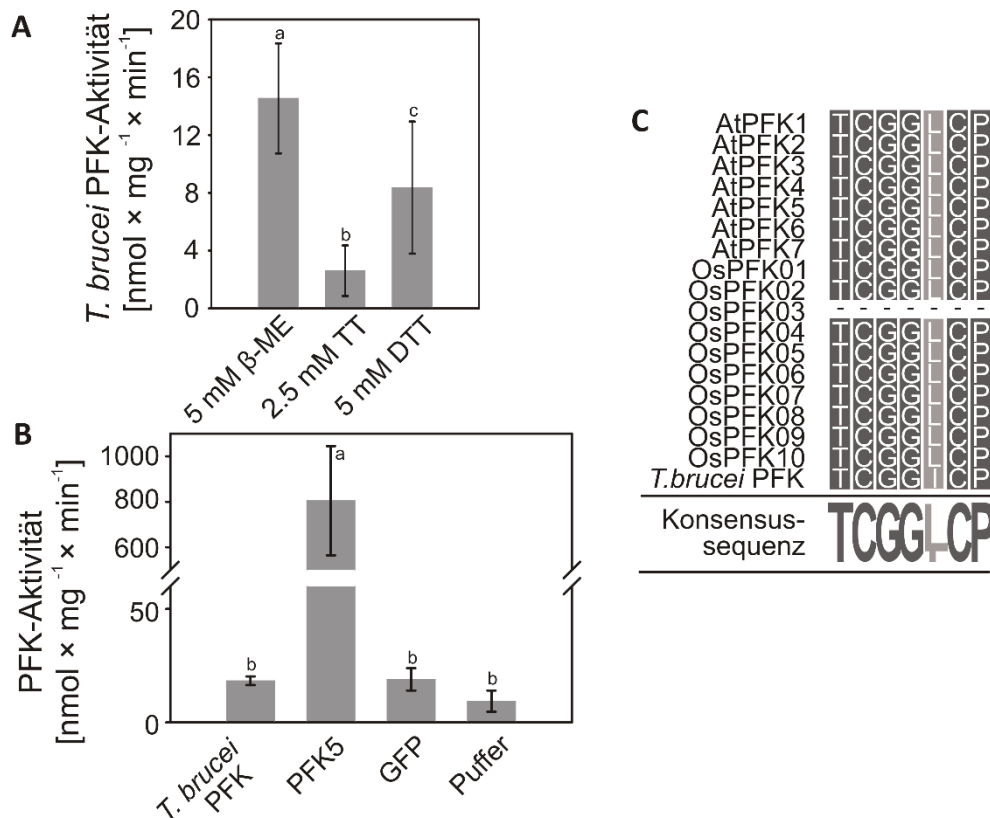


Abbildung 29: Redox-abhängige *T. brucei brucei* PFK-Aktivität. (A) Aus der *T. brucei brucei* (*T. brucei*) Wildtyp-Form 427 wurde unter reduzierenden Bedingungen mit β -Mercaptoethanol (β -ME) Gesamtprotein extrahiert und die PFK-Aktivität ermittelt. Anschließend wurde der Extrakt mit 2,5 mM Natriumtetrathionat (TT) oxidiert und mit 5 mM Dithiothreitol (DTT) erneut reduziert. (B) *T. brucei brucei* PFK, PFK5 und Puffer sowie GFP als Kontrolle wurden in Tabak infiltriert und überexprimiert, das Gesamtprotein extrahiert und die PFK-Aktivität gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Verschiedene Buchstaben indizieren signifikante Unterschiede (Anova, Tukey Test (A) $p > 0,05$, $n=6$ (B) $p > 0,001$; $n=4$). (C) Alignment Ausschnitt der Aminosäuresequenz des CGG(L/I)C-Motivs mit Konsensussequenz von *Arabidopsis thaliana*, Reis und *T. brucei brucei* PFKs.

Zur weiteren Analyse wurden konservierte Cysteine der plastidären PFK5 und der cytosolischen PFK3 mutagenisiert. Hierfür wurden in die Basensequenz der *Arabidopsis thaliana* PFK3 und PFK5 Mutationen eingeführt. Bei der anschließenden Proteintranslation führten diese Mutationen zu einem Aminosäureaustausch von Cystein nach Serin. Das Serin imitiert ein konstitutiv reduziertes Cystein. Die Cysteine des CGG(L/I)C-Motivs wurden bei der

PFK3 und PFK5 mutagenisiert, so dass sowohl Einzel- also auch Doppelmutationen der Cysteine dieses Motivs entstanden waren. Die Aktivität der nativen PFK5 betrug im reduzierten Zustand mit 5 mM β -Mercaptoethanol $1078 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ (Abbildung 30 A). Die Oxidation des Extraktes verursachte eine teilweise Verringerung der Aktivität, die durch die erneute Reduktion mit 5 mM DTT komplett wiederhergestellt werden konnte. Im Vergleich zum Wildtyp verursachte die C187S-Mutation bei der PFK5 im reduzierten Zustand eine 50 %ige Reduktion der Aktivität. Die PFK-Aktivität betrug $611,7 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. Die Oxidation und erneute Reduktion des Extraktes hatte keine Auswirkungen auf die ermittelte Aktivität. Bei der C191S-Mutation konnte im reduzierten Zustand im Vergleich zur wildtypischen PFK5 ebenfalls eine Halbierung der Aktivität auf $550,2 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ beobachtet werden. Im Vergleich zur C187S-Mutation war die C191S-Mutation gegenüber Oxidierung sensitiv. Bei der oxidierten Form der C191S-Mutation konnte eine Verringerung der Aktivität auf $111,7 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ beobachtet werden. Durch die anschließende Reduktion mit 5 mM DTT wurde die Aktivität der C191S-Mutation wiederhergestellt. Obwohl die Aktivität der oxidierten nativen PFK5 mit $114,7 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ bzw. der C191S-Mutation mit $111,7 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ im Vergleich zu der Pufferkontrolle mit $1,679 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ um das ca. 67-fache induziert war, konnte statistisch bedingt, kein signifikanter Unterschied ermittelt werden (Abbildung 30 A).

Bei der C187S-C191S-Doppelmutation des Motivs konnte bei allen Bedingungen im Vergleich zur wildtypischen PFK5 eine signifikante Verringerung der PFK-Aktivität ermittelt werden, dabei unterschied sich die Doppelmutation im reduzierten sowie im oxidierten Zustand nicht von der Puffer- sowie GFP-Kontrolle (Abbildung 30 B).

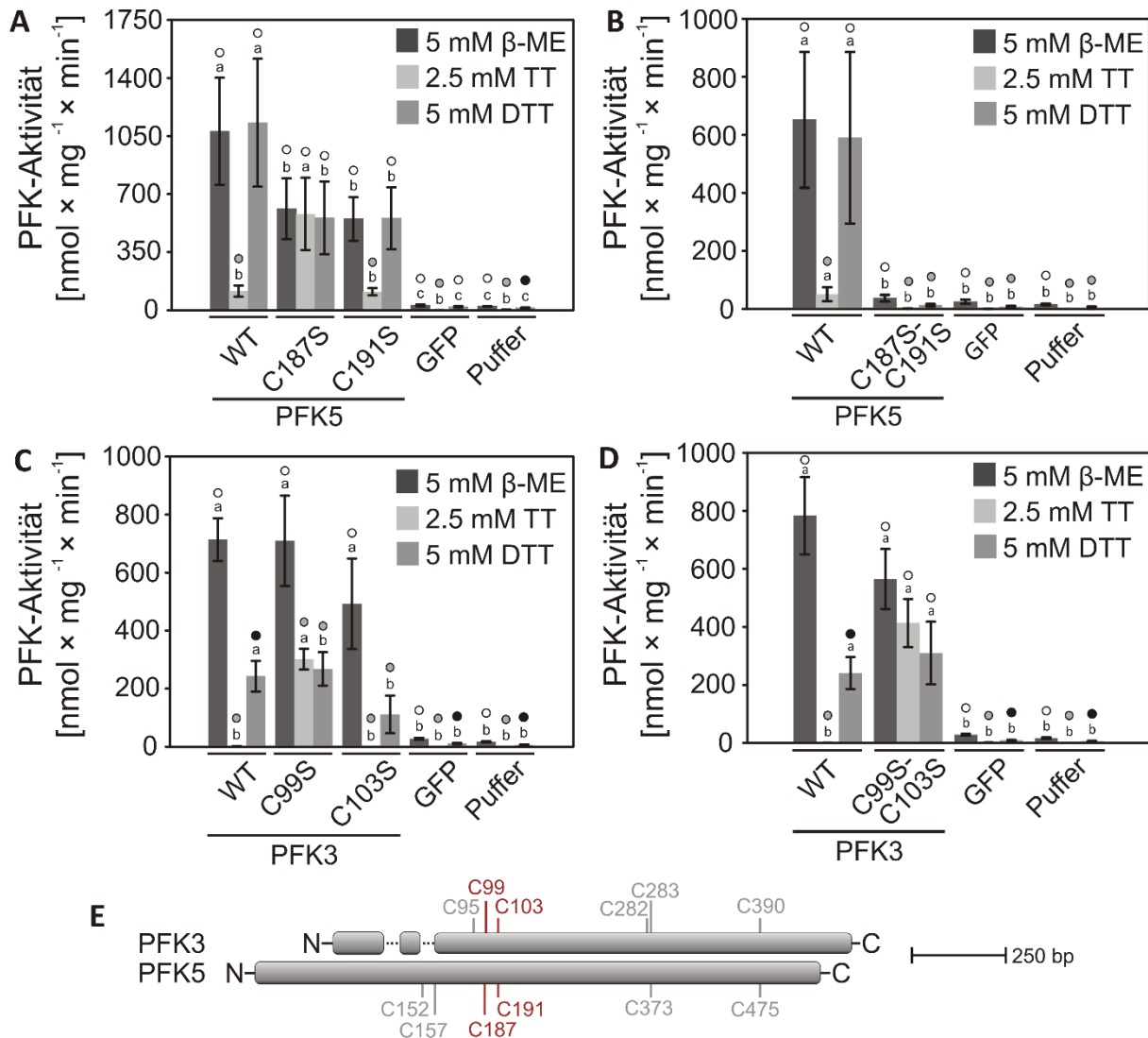


Abbildung 30: Regulation des CGG(L/I)C-Motivs von PFK3 und PFK5. Native *A. thaliana* PFK3 und PFK5 sowie (A und C) die PFK3- und PFK5-Einzelmutationen C187S, C191S, C99S, C103S und die (B und D) Doppelmutationen C187S-C191S, C99S-C103S beider Proteine wurden in *N. benthamiana* infiltriert und überexprimiert. Als Kontrolle wurden GFP und der Puffer verwendet. Nach drei Tagen wurden die Proben geerntet, unter reduzierenden Bedingungen mit β-Mercaptoethanol (β-ME) extrahiert und die PFK-Aktivität ermittelt. Anschließend wurden die Extrakte mit 2,5 mM Natriumtetrathionat (TT) oxidiert und mit 5 mM Dithiothreitol (DTT) erneut reduziert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb der jeweiligen Behandlung, wohingegen verschiedene Kreissymbole Unterschiede zwischen den Behandlungen innerhalb einer Probe anzeigen (Anova, Tukey Test $p > 0,05$, $n=3-4$). (E) Übersichtsskizze des Protein-Alignments der PFK3 und PFK5 mit der Position der konservierten Cysteine. Rot markiert sind die im jeweiligen Experiment zu Serinen mutierten Cysteine.

Zusätzlich zur plastidären PFK5 wurden in der cytosolisch lokalisierten PFK3 die Cysteine des CGG(L/I)C-Motivs mutagenisiert. Bei der nativen PFK3 wurde bei der Messung der Einzel- sowie der Doppelmutation unter reduzierenden Bedingungen mit 5 mM β-Mercaptoethanol eine Aktivität von 713,8 bzw. 783,3 nmol × mg⁻¹ × min⁻¹ bestimmt (Abbildung 30 C, D). Die

Oxidation resultierte in einer 99,86 bzw. 99,94 %igen Inhibition der Aktivität. Nach erneuter Reduktion mit 5 mM DTT wurde eine teilweise Regeneration der Aktivität auf 243,0 bzw. 240,1 nmol \times mg⁻¹ \times min⁻¹ beobachtet. Im reduzierten Zustand variierte die Aktivität der Einzel- sowie der Doppelmutation C99S, C103S und C99S-C103S zwischen 492,4 und 709,8 nmol \times mg⁻¹ \times min⁻¹. Durch Oxidation konnte im Vergleich zur nativen PFK3 bei der C99S Einzelmutation und der C99S-C103S-Doppelmutation keine komplette Inhibition der Aktivität erreicht werden. Hier betrug die Aktivität bei der C99S-Einzelmutation 301,3 nmol \times mg⁻¹ \times min⁻¹ und bei der C99S-C103S-Doppelmutation 413,4 nmol \times mg⁻¹ \times min⁻¹. Die Oxidation der C103S-Einzelmutation führte wie beim nativen PFK3-Protein zu einer kompletten Inhibition der PFK-Aktivität. Durch die erneute Reduktion mit 5 mM DTT konnte bei der C103S-Einzelmutante ein Teil der Aktivität wieder hergestellt werden, die Aktivität betrug in erneut reduziertem Zustand 111,4 nmol \times mg⁻¹ \times min⁻¹. Im Vergleich zum oxidierten Zustand führte wiederholte Reduktion bei der C99S-Einzelmutation und der C99S-C103S-Doppelmutation zu keiner zusätzlichen Wiederherstellung der Aktivität (Abbildung 30 C, D).

Da die Regulation eines Proteins nicht ausschließlich über Motive aus benachbarten Cysteinen erfolgt (Michelet et al., 2013), wurden bei der PFK3 und PFK5 zusätzlich hoch konservierte Cysteine innerhalb des Proteins zu Serinen mutagenisiert (Abbildung 31 D), in Tabak überexprimiert und die Aktivität unter reduzierenden und oxidierenden Bedingungen analysiert. Dabei kodierte die Aminosäuresequenz der PFK3 für die vier konservierten Cysteine C95, C282, C283 und C390. Bei C282 und C283 wurden gleichzeitig beide Cysteine verändert. Bei PFK5 waren lediglich die an Position 373 und 475 lokalisierten Cysteine konserviert und zu Serinen mutagenisiert worden. Initial variierte unter reduzierenden Bedingungen die Aktivität der nativen PFK3 sowie der C95S- und C390S-Einzelmutation zwischen 468,2 und 713,8 nmol \times mg⁻¹ \times min⁻¹. Die anschließende Oxidation führte bei diesen Proben zur kompletten Inhibition der PFK-Aktivität. Die wiederholte Reduktion verursachte jedoch nur bei der nativen PFK3 eine teilweise Regeneration der PFK-Aktivität. Die Aktivität der C95S- und C390S-Einzelmutation unterschied sich im erneut reduzierten Zustand mit 5 mM DTT nicht von den Kontrollen (Abbildung 31 A). Die C282S-C283S-Doppelmutation verursachte eine komplette Verringerung der Aktivität. Hier konnte im Vergleich zu den Kontrollen im oxidierten sowie im reduzierten Zustand kein signifikanter Unterschied ermittelt werden (Abbildung 31 B). Wie bereits gezeigt, wies die native PFK5 im Vergleich zu den Kontrollen eine stark induzierte Aktivität von 1078 nmol \times mg⁻¹ \times min⁻¹ auf, die durch die Oxidation des Extraktes partiell auf 114,7 nmol \times mg⁻¹ \times min⁻¹ inhibiert und durch erneute Reduktion mit 5 mM DTT komplett wiederhergestellt werden konnte (Abbildung 31 C). Bei den beiden PFK5 C373S- und C475S-Einzelmutationen wurde unter reduzierenden Bedingungen im Durchschnitt eine Aktivität von 655,0 nmol \times mg⁻¹ \times min⁻¹ detektiert. Nach Oxidation fiel die

Aktivität bei beiden Mutationen auf 9,861 bzw. 9,983 nmol \times mg⁻¹ \times min⁻¹ und konnte, vergleichbar zur nativen PFK5, nach der erneuten Reduktion auf das Ausgangsniveau der jeweiligen Mutation regeneriert werden (Abbildung 31 C).

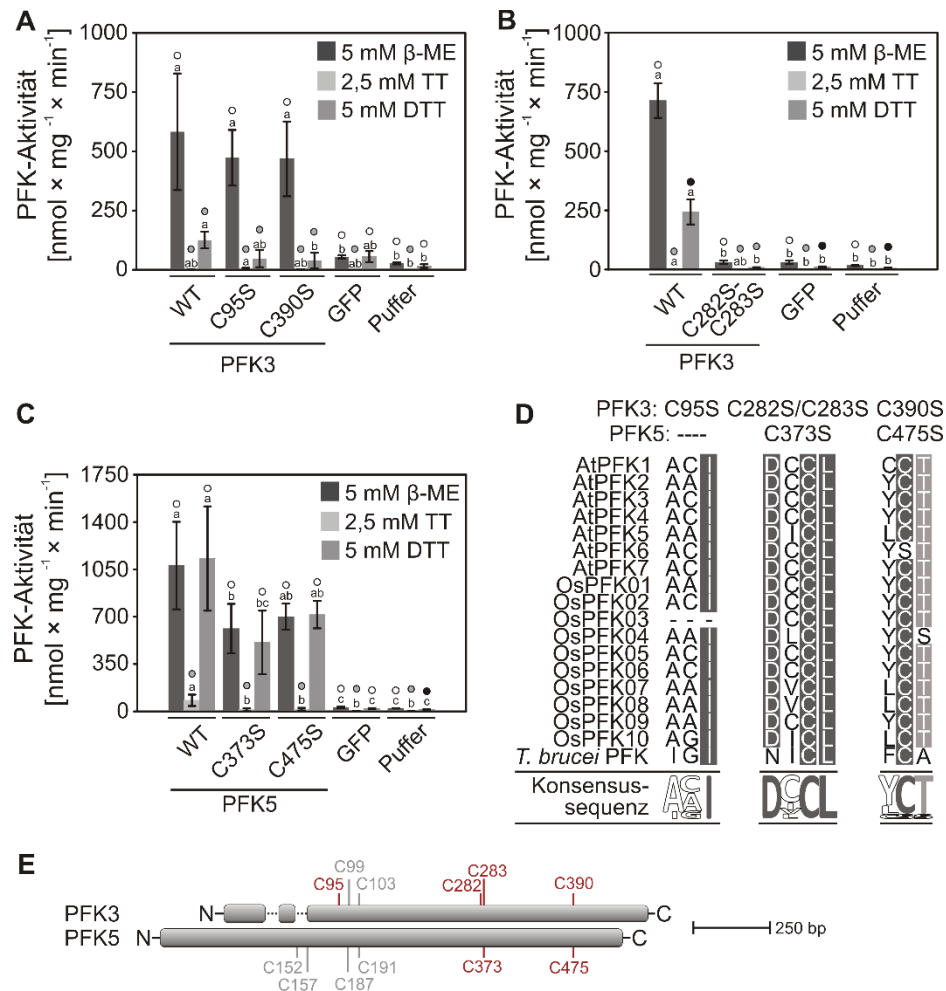


Abbildung 31: Redox-Regulation konservierter Cysteine der PFK3 und PFK5. (A und C) Native *A. thaliana* PFK3 und PFK5 sowie die PFK3- und PFK5-Einzelmutationen C95S, C390S, C373S, C475S und die (B) PFK3-Doppelmutation C282S-C283S wurden in *N. benthamiana* infiltriert und überexprimiert. Als Kontrolle wurde GFP und der Puffer verwendet. Nach drei Tagen wurden die Proben geerntet und unter reduzierenden Bedingungen mit β -Mercaptoethanol (β -ME) extrahiert. Anschließend wurden die Proben mit 2,5 mM Natriumtetrathionat (TT) oxidiert und mit 5 mM (Dithiothreitol) DTT erneut reduziert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb der jeweiligen Behandlung, wohingegen verschiedene Kreissymbole Unterschiede zwischen den Behandlungen innerhalb einer Probe anzeigen (Anova, Tukey Test $p > 0,05$, $n=3-4$). (D) Alignment Ausschnitt der konservierten Cysteine mit Konsensussequenz von *Arabidopsis thaliana*, Reis und *T. brucei* (*T. brucei*) PFKs. (E) Übersichtsskizze des Protein-Alignments der PFK3 und PFK5 mit der Position der konservierten Cysteine. Rot markiert sind die im jeweiligen Experiment zu Serinen mutierten Cysteine.

3.9.5 Analyse des CXXXXC-Motivs bei PFK5

Anhand der jeweiligen Aminosäuresequenz von PFK3, PFK4 und PFK5 wurde unter Verwendung des internetbasierten Programmes *phyre2* (Kelley und Sternberg, 2009) eine 42 %ige Übereinstimmung mit dem PFK-Apoenzym von *Trypanosoma brucei brucei* bestimmt. Die Struktur des *T. brucei brucei* PFK-Apoenzym ist 2008 vollständig aufgeklärt worden (McNae et al., 2009). Basierend auf dieser Übereinstimmung wurde die PFK3, PFK4 und PFK5 Proteinstruktur vorhergesagt (Abbildung 32). Für die PFK3 und PFK5 wurden alle stark konservierten und mutagenisierten Cysteine rot hervorgehoben. Bei der PFK4 wurden lediglich die Cysteine des CGG(L/I)C-Motivs rot markiert. Bei der Darstellung der Sekundärstrukturen (Abbildung 32 A, C, E) konnte die Position der hervorgehobenen Cysteine innerhalb des Proteins nachvollzogen werden, dabei waren die Cysteine über das gesamte Protein verteilt. Bei der Ansicht der Oberflächenstruktur (Abbildung 32 B, D, F) waren lediglich an einem Arm des Proteins befindliche Cysteine des CXXXXC-Motivs (C152 und C157) deutlich sichtbar. Ein Cystein des CGG(L/I)C-Motivs (Abbildung 32 (A): C99, (C): C187 und (E): C150) war tief in einer kleinen Proteintasche eingebettet erkennbar, die übrigen Cysteine wurden durch die Protein-Oberfläche maskiert.

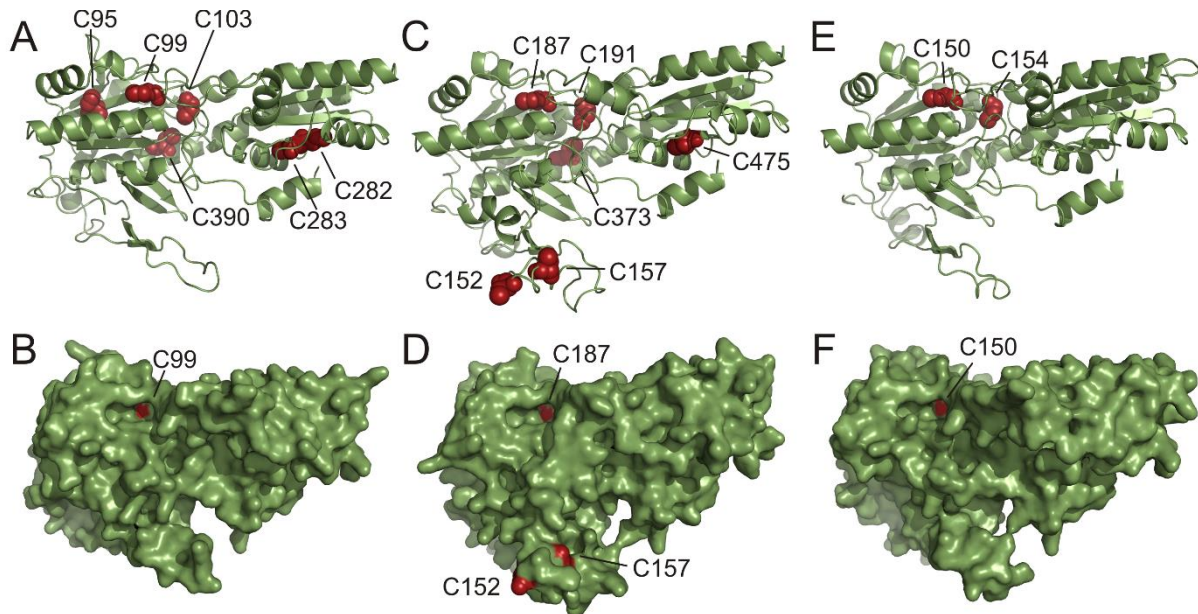


Abbildung 32: Vorhergesagte Struktur von PFK3, PFK4 und PFK5. Anhand der jeweiligen Aminosäuresequenz von PFK3, 4 und 5 wurde mit dem Programm *phyre2* eine Übereinstimmung von 42 % mit dem PFK-Apoenzym von *T. brucei brucei* ermittelt und, basierend darauf, die jeweilige Struktur vorhergesagt. Dargestellt sind die Sekundärstruktur von *PFK3* (A), *PFK5* (C) und *PFK4* (E) mit ausgewählten rot markierten konservierten Cysteinen und ihrer jeweiligen Position im Protein, sowie die Oberflächenstruktur von *PFK3* (B), *PFK5* (D) und *PFK4* (F). Die Proteinstrukturen wurden mit dem Programm *pymol* visualisiert.

Das CXXXXC-Motiv kodierte für zwei Cysteine, die durch vier variable Aminosäuren getrennt waren. Es war innerhalb der plastidär lokalisierten Mitglieder der Gruppe I stark konserviert (Abbildung 20 und Abbildung 33 C). Die zwei Cysteine des CXXXXC-Motivs C152 und C157 wurden bei der PFK5 zu Serinen mutagenisiert. Zugleich wurde eine Doppelmutation, bei der beide Cysteine verändert wurden, hergestellt und die PFK-Aktivität unter reduzierenden und oxidierenden Bedingungen ermittelt. Die native, nicht mutagenisierte PFK5 hatte unter reduzierenden Bedingungen eine PFK-Aktivität von $1078 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ (Abbildung 33 A) bzw. $600,6 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ (Abbildung 33 B). Die Oxidierung verursachte eine partielle, signifikante Verringerung der PFK-Aktivität, die nach erneuter Reduktion komplett wieder hergestellt werden konnte. Alle Mutationen des CXXXXC-Motivs zeigten jedoch drastisch verringerte PFK-Aktivitäten im Vergleich zur Wildtyp-PFK5. Die PFK-Aktivität der beiden PFK5 C152S- und C157S-Einzelmutationen sowie der C152S-C157S-Doppelmutation unterschied sich weder im reduzierten noch im oxidierten Zustand von der Puffer- und GFP-Kontrolle.

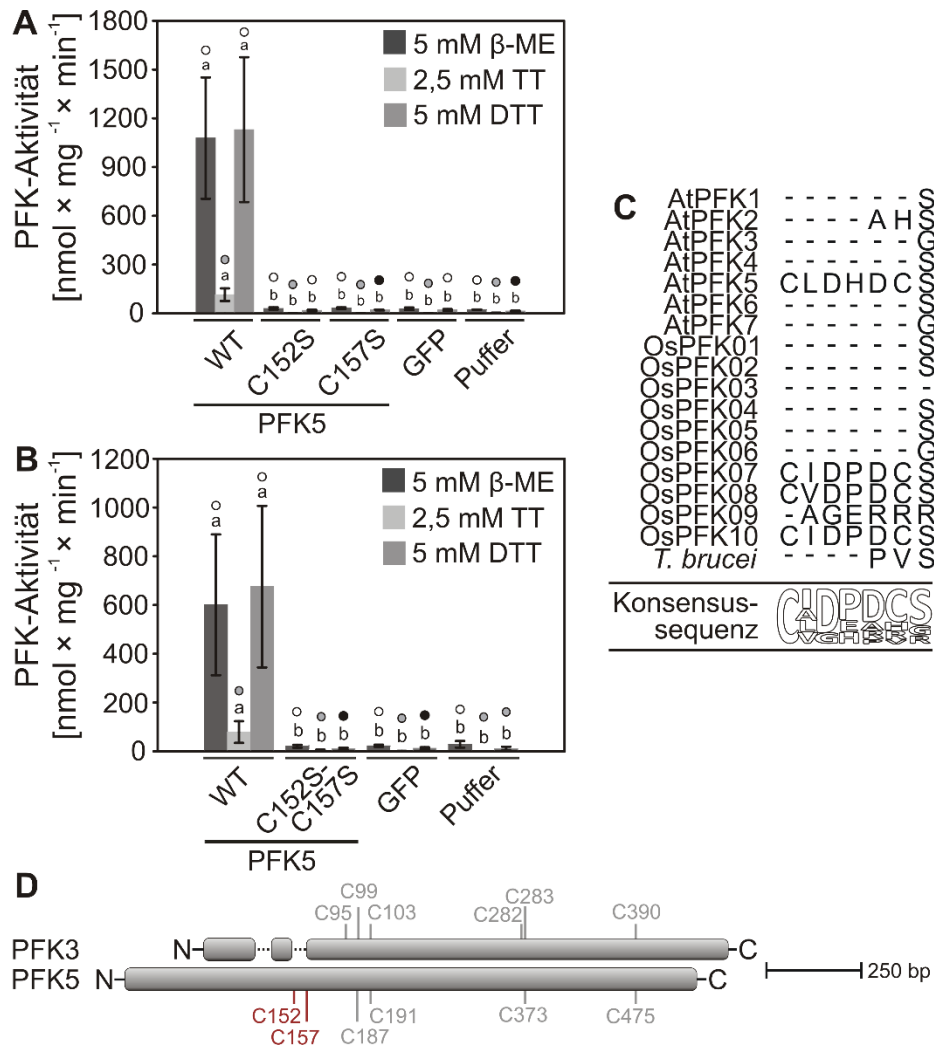


Abbildung 33: Regulation des CXXXXC-Motivs von PFK5. *A. thaliana* PFK5 Wildtyp sowie die (A) Einzelmutationen C152S, C157S und die (B) Doppelmutation C152S-157S wurde in *N. benthamiana* infiltriert und überexprimiert. Als Kontrolle wurde GFP und der Puffer verwendet. Nach drei Tagen wurden die Proben geerntet und unter reduzierenden Bedingungen mit β-Mercaptoethanol (β-ME) extrahiert, anschließend mit 2,5 mM Natriumtetrathionat (TT) oxidiert und mit 5 mM Dithiothreitol (DTT) erneut reduziert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb der jeweiligen Behandlung, wohingegen verschiedene Kreissymbole Unterschiede zwischen den Behandlungen innerhalb einer Probe anzeigen (Anova, Tukey Test $p > 0,05$, $n=3-4$). (C) Alignment Ausschnitt der Aminosäuresequenz des CXXXXC-Motivs mit Konsensussequenz von *Arabidopsis thaliana*, Reis und *T. brucei brucei* PFKs. (D) Übersichtsskizze des Protein-Alignments der PFK3 und PFK5 mit der Position der konservierten Cysteine. Rot markiert sind die im jeweiligen Experiment zu Serinen mutierten Cysteine.

Um zu überprüfen, ob die PFK5 Redox-reguliert war, wurde die PFK-Aktivität der in Tabak transient überexprimierten *Arabidopsis thaliana* PFKs und des Puffers unter teilweise denaturierenden Bedingungen, modifiziert nach Scheibe et al. (1986), analysiert. Dabei wurde der Extrakt zuerst bei einem pH von 9,0 und 500 mM NaCl denaturiert und mit 10 mM DTT

reduziert. Bei der Kontrolle unter denaturierenden Bedingungen ohne zusätzliche Reduktion mit 10 mM DTT konnte für PFK1 eine PFK-Aktivität von $472 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ gemessen werden, wohingegen die PFK2 eine PFK-Aktivität von 44,0 die PFK3 von 542, die PFK4 von 235, die PFK5 von 827, die PFK6 von 272, die PFK7 von 547 und der Puffer einer Aktivität von $17,6 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ aufwies. Lediglich die Aktivität der PFK5 war nach der Reduzierung mit 10 mM DTT von $827 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ auf $383 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ verringert (Abbildung 34 A). Im Vergleich zu den übrigen PFKs und dem Puffer entsprach dies einer signifikanten Inhibition der Aktivität von 53 % (Abbildung 34 B).

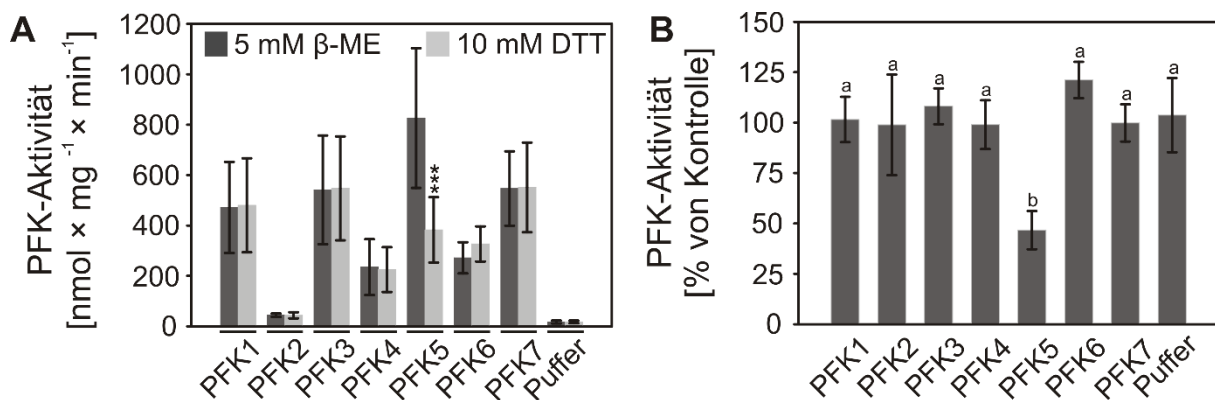


Abbildung 34: Reduktion der PFK5-Aktivität. *A. thaliana* PFK 1-7 sowie Puffer als Kontrolle wurden in *N. benthamiana* infiltriert und überexprimiert. Nach drei Tagen wurden die Proben geerntet und unter reduzierenden Bedingungen mit 5 mM β-Mercaptoethanol (β-ME) extrahiert. Anschließend wurde der Extrakt unter teilweise denaturierenden Bedingungen bei pH 9,0 und 500 mM NaCl zusätzlich mit 10 mM Dithiothreitol (DTT) reduziert. Dargestellt sind die absoluten PFK-Aktivitäten (A) und die Reduktion der Aktivität in Prozent (B). Verschiedene Buchstaben und Sternchen indizieren signifikante Unterschiede (Anova, Tukey Test $p > 0,001$, $n=10$).

Die lichtabhängige Regulation der PFK5 wurde, modifiziert nach Heuer et al. (1982), analysiert. PFK5, PFK4 und Puffer wurden in Tabak infiltriert und überexprimiert und die Pflanzen mit Licht (Abbildung 35 A, C, D) bzw. Dunkelheit (Abbildung 35 B) vorbehandelt. Anschließend wurden die Chloroplasten angereichert und der Chloroplasten-Extrakt illuminiert bzw. mit Dunkelheit behandelt. Als Kontrolle wurde die PFK4 ausgewählt, weil diese PFK plastidär lokalisiert ist, jedoch im Vergleich zur PFK5 nicht das CXXXXC-Motiv kodiert. Die Behandlung der Chloroplasten-Extrakte mit Licht verursachte bei der PFK5 eine signifikante Reduktion der PFK-Aktivität. Im Vergleich zu den mit Dunkelheit behandelten Chloroplasten-Extrakten konnte unabhängig von der ATP-Konzentration bei den illuminierten Extrakten der PFK5 eine Reduktion der PFK-Aktivität auf 22 % bis 34 % ermittelt werden. Dabei hatte die Vorbehandlung der gesamten Pflanze keinen Einfluss auf die lichtabhängige Verringerung der PFK-Aktivität nach Behandlung des Chloroplasten-Extraktes (Abbildung 35 A, B). Aus diesem

Grund wurde bei der Analyse der PFK4 und Kontrolle auf die Vorbehandlung der Pflanze mit Dunkelheit verzichtet. Bei der Pufferkontrolle und der PFK4 konnte im Gegensatz zur PFK5 keine signifikante Verringerung der PFK-Aktivität beobachtet werden, nachdem die Chloroplasten-Extrakte mit Licht illuminiert wurden (Abbildung 35 C, D). Die Analyse der PFK-Aktivität bei unterschiedlichen ATP-Konzentrationen ergab zudem, dass bei keiner der analysierten PFKs eine Verschiebung des K_m -Wertes gegenüber dem Substrat ATP beobachtet werden konnte. Außerdem bestätigten diese Analysen die chloroplastidäre Lokalisation von PFK4 und PFK5.

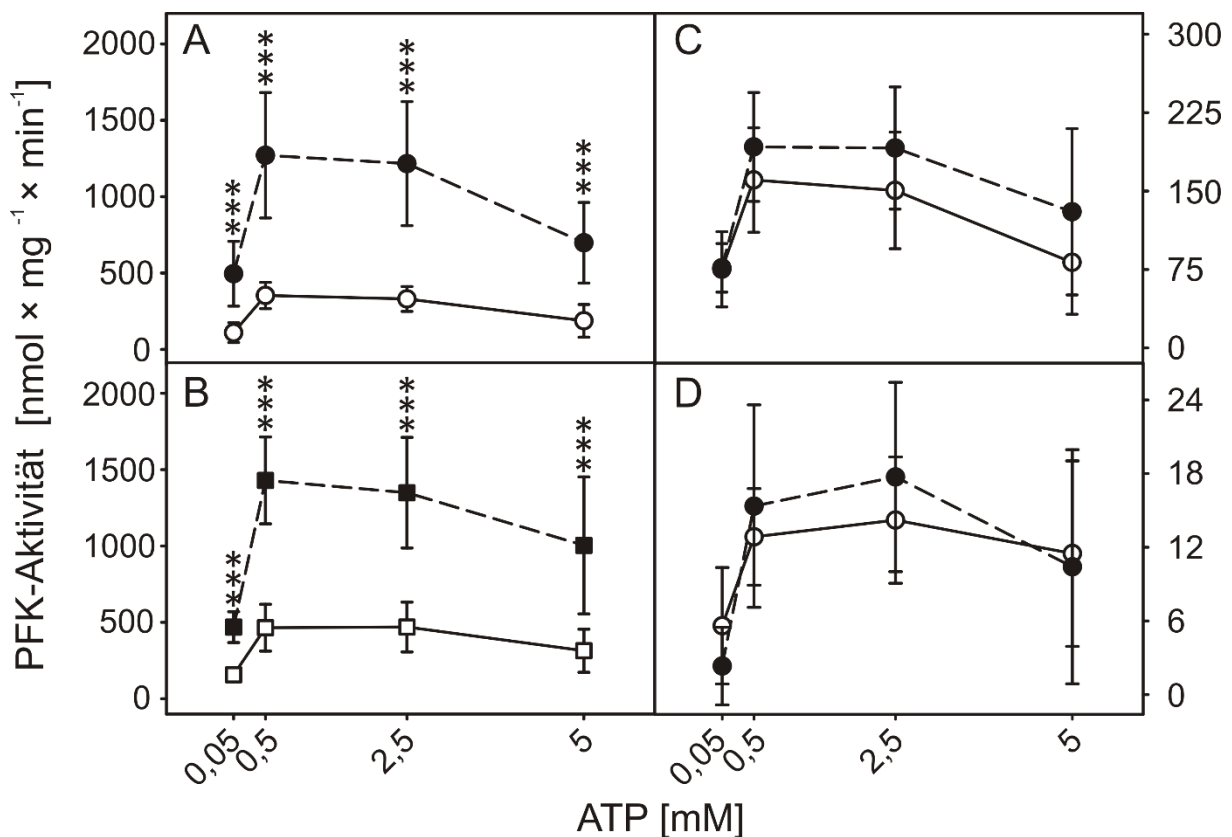


Abbildung 35: Lichtabhängige Reduktion der PFK5 Aktivität. *A. thaliana* PFK5 (A/B) und PFK4 (C) sowie der Puffer (D) wurde in *N. benthamiana* infiltriert und überexprimiert. Nach drei Tagen wurden die Pflanzen mit einer Stunde Licht (●/○) bzw. Dunkelheit (■/□) vorbehandelt. Anschließend wurden aus den Blättern isolierte Chloroplasten für eine Stunde mit 1000 μE (○/□) illuminiert bzw. in Dunkelheit (●/■) inkubiert. Die Chloroplasten wurden pelletiert und die Proteine unter reduzierenden Bedingungen mit β -Mercaptoethanol extrahiert. Die PFK-Aktivität wurde bei verschiedenen ATP-Konzentrationen ermittelt. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte \pm SD dar. Sternchen indizieren signifikante Unterschiede (T-Test, $p < 0,001$, $n=10$).

4 Diskussion

4.1 OsPFPβ ist ein potentiell essentielles Allel

Reis ist für einen Großteil der Weltbevölkerung das Grundnahrungsmittel und 49 % der weltweit verzehrten Kalorien stammen aus Reis. 2010 befanden sich 88 % der globalen Reis-Anbaufläche in Asien (FAO Statistical Yearbook 2012). Mit zunehmendem Klimawandel werden Farmer immer häufiger mit schädigenden Umweltereignissen konfrontiert. Dabei verursachen Umweltfaktoren wie Dürren, Salzstress und Überflutung die größten Ernteeinbußen (Zeng et al., 2001; Bouman et al., 2005; Chen et al., 2011). So werden z.B. über 50 % der Reisproduktion in Vietnam an Flussdeltas erzeugt (Nguyen Thi Minh et al., 2002), die durch den steigenden Meeresspiegel und den zunehmenden Monsunregen besonders stark gefährdet sind (Wassmann et al., 2009). Überflutung ist ein Ereignis, dass sich aus einem Komplex vieler Stressfaktoren zusammensetzt. Der bei Überflutung auftretende Sauerstoffmangel und die dadurch hervorgerufene Energiekrise spielen für das Überleben der Pflanzen eine entscheidende Rolle (Greenway und Gibbs, 2003; Mustroph et al., 2014). Die Pflanzen müssen das verringerte Energieangebot bewältigen, indem sie sich metabolisch und morphologisch an die neue Situation anpassen. Neben der Ausbildung von Aerenchymen, Adventivwurzeln sowie der Sprosselongation sind Reispflanzen bei Überflutung zu einer Vielzahl transkriptioneller und metabolischer Anpassungsmechanismen in der Lage (z. B. Drew et al., 2000; Mergemann und Sauter, 2000; Vriezen et al., 2003; Lasanthi-Kudahettige et al., 2007; Bailey-Serres und Voesenek, 2008; Miro und Ismail, 2013). So ist Reis eine der wenigen Spezies, deren Keimungsrate unter Anoxie nur marginal beeinträchtigt wird (Alpi und Beevers, 1983). Im Vergleich zu intoleranten Spezies wird unter hypoxischen Bedingungen beim toleranten Reis ein umfangreiches Set an Genen des Kohlenhydratstoffwechsels induziert (Lasanthi-Kudahettige et al., 2007; Bailey-Serres und Voesenek, 2008). In Studien zu essentiellen Genen bei den Mikroorganismen *Streptococcus sanguinis* und *Bacillus subtilis* konnte gezeigt werden, dass die für das Überleben der Mikroorganismen notwendigen Gene oft in Stoffwechselwegen, wie z.B. der Glycolyse, Cluster bilden (Commichau et al., 2009; Xu et al., 2011). Commichau et al. (2009) zeigten, dass die essentiellen Gene der Glycolyse wie die PFK und die Enolase in *Bacillus subtilis* einen Komplex mit Proteinen der RNA-Prozessierung bilden. Daraus schlussfolgerten die Autoren, dass die Interaktion der PFK und der Enolase mit Proteinen des RNA-Metabolismus zu ihrer Notwendigkeit beiträgt. Im Gegensatz zu Mikroorganismen und Menschen besitzen Pflanzen eine deutlich komplexere Glycolyse. Neben der cytosolischen Glycolyse existiert in Pflanzen auch die plastidäre Glycolyse. Zudem verfügen sie über alternative Enzyme, die anstatt von ATP als Phosphatdonor PPi verwenden. So gibt es in

Pflanzen neben der ATP-abhängigen PFK auch die PPi-abhängige PFP. Beide Enzyme phosphorylieren Fru6P zu Fru2,6BP (Plaxton, 1996). Die PFP bildet generell ein Heterotetramer aus der regulatorischen α - und der katalytischen β -Untereinheit (Yan und Tao, 1984; Kruger und Dennis, 1987; Wong et al., 1990; Todd et al., 1995; Theodorou und Plaxton, 1996). Das Reis-Genom kodiert für nur eine β -Untereinheit der PFP. Die analysierte *Oryza sativa* PFP T-DNA-Insertionsmutante PFG_2D-31392.R verursachte eine komplette Deletion der *OsPFP β* -Expression (Abbildung 5 C) und homozygote Pflanzen zeigten nach 2,5 Monaten Wachstum einen letalen Phänotyp (Abbildung 3 B, C). Daneben konnte aus homozygotem Kallusgewebe dieser T-DNA-Insertionsmutante kein Sprossgewebe regeneriert werden, während aus dem heterozygoten Kallusgewebe Pflanzen regeneriert werden konnten. Aus diesem Grund wurde im Labor die Transformation von *Oryza sativa* ssp. Japonica cv. Nipponbare etabliert (Abbildung 6). Durch die Verwendung eines RNAi-Konstruktes sollte die partielle Deletion des Gens erfolgen. Zusätzlich dazu sollte durch die Transformation eines Estradiol-induzierbaren *OsPFP β* RNAi-Konstruktes eine temporal gezielte Deletion des *PFP*-Gens ermöglicht werden. Obwohl unter Verwendung eines Estradiol-induzierbaren GFPs die Transformation erzielt werden konnte (Abbildung 7), gelang die Transformation eines induzierbaren *OsPFP β* RNAi-Konstruktes nicht. Nachdem das konstitutive pH7GWIWG2,0:*OsPFP β* RNAi-Konstrukt in *Oryza sativa* ssp. Japonica cv. Nipponbare transformiert wurde, konnten mehrere unabhängige pH7GWIWG2,0:*OsPFP β* RNAi-Linien identifiziert werden. Dabei wurde die RNAi E1 Linie selektiert, die im Vergleich zum *Oryza sativa* ssp. Japonica cv. Nipponbare Wildtyp und den anderen RNAi-Linien genauso wie die homozygote T-DNA-Insertionsmutante PFG_2D-31392.R nicht in der Lage war, Sprossgewebe zu regenerieren (Abbildung 8). Die *OsPFP β* -Transkriptmenge war in der RNAi-Linie E1 deutlich reduziert (Abbildung 9 A). Beim Kallusgewebe sowohl der homozygoten PFG_2D-31392.R T-DNA-Mutante als auch der E1 RNAi-Linie konnte eine komplette Inhibition der PFP-Aktivität ermittelt werden (Abbildung 5 B und Abbildung 9 B). Die komplette Inhibition der PFP-Aktivität könnte für den letalen Phänotyp der T-DNA und das Unvermögen des Kallus, Sprossgewebe zu regenerieren verantwortlich sein.

Eine starke Reduktion der *PFP*-Expression und -Aktivität hatte beim transgenen *Solanum tuberosum* sowie in *Nicotiana tabacum* keine Auswirkungen auf das Wachstum und den Phänotyp der Pflanzen (Hajirezaei und Stitt, 1991; Paul et al., 1995). So verursachte eine 45-95 %ige Reduktion der PFP-Aktivität bei transgenen *Saccharum* ssp. Pflanzen ebenfalls keine phänotypischen Veränderungen (van der Merwe et al., 2010). Bei den im Rahmen dieser Arbeit identifizierten *Arabidopsis thaliana* PFP T-DNA-Insertionsmutanten konnten trotz reduzierter PFP-Aktivität keine phänotypischen Unterschiede zum Wildtyp beobachtet werden. Dagegen konnten Lim et al. (2009) bei *Arabidopsis thaliana* RNAi-Linien mit reduzierter *PFP*-Expression und PFP-Aktivität einen verringerten Durchmesser bei den Rosetten der Pflanzen

sowie geringeres Frischgewicht beobachten. Diese Diskrepanz wird später diskutiert. Bislang konnte jedoch in keinem höheren Organismus die Letalität einer PFP β -RNAi oder -Mutante nachgewiesen werden.

4.1.1 Letalität beruht auf der Akkumulation von Zucker

Anschließend wurden aus dem Kallusgewebe der E1 RNAi-Linie von *Oryza sativa* Metabolite extrahiert und der Gehalt von Stärke, Glucose, Fructose, Saccharose, Glu6P, Fru6P, Pyruvat, PEP sowie ATP und ADP ermittelt. Bei den meisten Zuckern, die der PFP-Enzymreaktion vorgelagert waren, konnte in der RNAi-Linie E1 eine Akkumulation beobachtet werden (Abbildung 10). Das direkte Substrat der Enzymreaktion Fru6P war 2,5-fach erhöht, während bei Glucose eine 5-fache, bei Stärke eine 3,5-fache und bei Saccharose eine 25-fache Anreicherung im Kallusgewebe der RNAi-Linie E1 ermittelt werden konnte. Diese Daten lassen zuerst darauf schließen, dass die OsPFP im Kallusgewebe in die glycolytische Richtung arbeitet. Die Auswirkungen partieller bzw. kompletter Inhibierung der *OsPFP β* -Expression bzw. PFP-Aktivität auf die Verteilung von Stoffen des Kohlenhydratmetabolismus wurden bereits in zahlreichen Spezies wie *Arabidopsis thaliana*, *Saccharum* spp., *Nicotiana tabacum* beschrieben (Paul et al., 1995; Nielsen und Stitt, 2001; Lim et al., 2009; Groenewald und Botha, 2008; van der Merwe et al., 2010). So beobachteten Lim et al. (2009) bei PFP RNAi-Mutanten von *Arabidopsis thaliana* eine deutliche Wachstumsretardation, jedoch konnte abgesehen von einer leichten Verringerung des Saccharosegehaltes am Ende des Tages keine weitere Korrelation zwischen Expression in den Mutanten und Zuckergehalt ermittelt werden. Mit einem PFP β RNAi-Konstrukt transformierte *Nicotiana tabacum*-Pflanzen wiesen einen 80 bis 90 %ige Reduktion der PFP-Aktivität auf. Die Pflanzen hatten mehr Fru2,6BP, jedoch gab es keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Kohlenhydrate (Nielsen und Stitt, 2001). Dagegen konnten Groenewald und Botha (2008) in jungen Internodien von *Saccharum* spp. mit reduzierter PFP-Aktivität eine Anreicherung von Saccharose nachweisen.

Lösliche Zucker wie Glucose und Saccharose dienen als regulatorische Moleküle bei der Samen- und Embryoentwicklung, regulieren das Wachstum der Pflanzen sowie physiologische Prozesse wie die Photosynthese und die Blühinduktion. Die Zufuhr exogenen Zuckers oder seine Akkumulation kann gravierende Auswirkungen auf das Wachstum sowie die Genexpression der Pflanzen haben und wurde schon durch zahlreiche Autoren beschrieben (Koch, 1996; Smeekeens, 1998; Pego et al., 2000; Gazzarrini und McCourt, 2001; Ohto et al., 2001; Zakhleniuk et al., 2001; Borisjuk et al., 2004; Lloyd und Zakhleniuk, 2004; Gibson, 2005; Zhu et al., 2009; Tahchy et al., 2011). *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen, die auf 0,3 M Saccharose angezogen wurden, zeigten eine signifikant verzögerte Keimung und die

Mehrheit der Keimlinge war nicht in der Lage, grüne Kotyledonen oder Blätter zu entwickeln (Gibson, 2000). Die *pho3*-Mutante kodierte in *Arabidopsis thaliana* für eine defekte Kopie des *SUCROSE TRANSPORTER 2* (*SUC2*)-Gens. Dies resultierte in einem reduzierten Saccharose-Transport vom Spross zur Wurzel, wobei die Pflanzen mit dieser Mutation sehr viel Saccharose in den Blättern akkumulierten (Zakhleniuk et al., 2001; Lloyd und Zakhleniuk, 2004). Im adulten Stadium wiesen die Pflanzen eine chaotische Blattmorphologie auf, sie produzierten grünes Gewebe, dass zum einen blattähnlich, zum anderen kallusähnlich war (Gottwald et al., 2000).

Dekkers et al. (2004) untersuchten den Einfluss von Glucose auf die Keimungsrate von *Arabidopsis thaliana*, dabei wurden Pflanzen bei Glucosekonzentrationen von 0,5 bis 5 % zur Keimung gebracht. Schon bei 1 % Glucose konnte nach 24 Stunden eine deutliche Inhibition der Keimung beobachtet werden (Dekkers et al., 2004). Andere Autoren haben bei der Anzucht von *Arabidopsis thaliana* auf Glucose vergleichbare Resultate beschrieben (To et al., 2002; Ullah et al., 2002). Unter der Verwendung von Kontrollen wie Sorbitol, NaCl und Mannose konnte in diesen Studien ausgeschlossen werden, dass die Inhibition der Keimung durch osmotischen Stress bedingt war. Des Weiteren zeigten Price et al. (2003), dass selbst bei physiologisch relevanter Glucosekonzentration die Keimung von *Arabidopsis thaliana*-Samen verzögert wird. Glucose induziert die Expression von Genen, die für die Biosynthese des Phytohormons Abscisinsäure (ABA) verantwortlich sind (Price et al., 2003). Die Akkumulation von ABA wird mit negativen Auswirkungen für die Samenkeimung in Zusammenhang gebracht (Li et al., 2001; Cheng et al., 2002; Chen et al., 2006).

In Reis konnte ebenfalls die Glucose-induzierte Anreicherung von ABA und die damit einhergehende Verzögerung der Samenkeimung nachgewiesen werden. Dabei resultierte die Anreicherung von ABA eher aus der Suppression des Katabolismus als aus der Induktion der ABA-Biosynthese (Zhu et al., 2009; Song et al., 2012). Aus den bisher publizierten Daten könnte geschlossen werden, dass die Inhibition der Sprossregeneration durch die massive Anreicherung von Glucose und vor allem von Saccharose im Kallusgewebe ausgelöst wurde. Ob der Keimling der OsPFPβ T-DNA-Insertionsmutante PFG_2D-31392.R ebenfalls Zucker akkumuliert, konnte aus dem Mangel an genügend homozygoten Pflanzenmaterial bislang nicht nachgewiesen werden. Dagegen spricht jedoch, dass in keiner der bis zum jetzigen Zeitpunkt untersuchten Pflanzenarten sich die teilweise stark reduzierte PFP-Aktivität in einer gravierenden metabolischen bzw. phänotypischen Abweichung widerspiegelt.

Neben der RNAi-Linie E1 konnten die weiteren resistenten RNAi-Linien E3 bis E6 selektiert werden. Im Kallusgewebe war die PFP-Aktivität bei allen Linien im Vergleich zum Wildtyp im Durchschnitt um ca. 50 % reduziert (Anhang, Abbildung 40). Korrespondierend dazu war das Transkriptlevel bei den Linien E3 bis E6 leicht erniedrigt (Abbildung 11 A); jedoch zeigten die

adulten Pflanzen dieser Linien keine Inhibition der PFP-Aktivität (Abbildung 11 B). Zur näheren Untersuchung wurden die Nachkommen der T2-Generation analysiert. Hierbei konnten im Vergleich zum Wildtyp bei 21 Tage alten OsPFP β RNAi-Reispflanzen der T2-Generation Individuen mit sowohl reduzierter als auch gleicher oder erhöhter PFP-Aktivität identifiziert werden (Anhang, Abbildung 42). Aufgrund des Mangels an genügend Pflanzenmaterial wurden ausgewählte Individuen der OsPFP β RNAi T2-Generation (Abbildung 12) für weitere 5 Wochen angezogen. Zur funktionellen Analyse sollten die Aktivität sowie der Metabolitgehalt unter anoxischen Bedingungen untersucht werden. Dazu wurden die Blätter der adulten Pflanzen in Wasser platziert und mit Stickstoff begast. Im Durchschnitt wurde bei den mit Sauerstoffmangel behandelten Pflanzen des Nipponbare Wildtyps sowie bei den OsPFP β RNAi-Pflanzen der T2-Generation eine 6,2-fache Induktion der ADH-Aktivität ermittelt (Abbildung 13 B). Selbst unter hypoxischen Bedingungen konnten jedoch bei der anschließenden Bestimmung der PFK/PFP-Aktivität sowie der ADP- und ATP-Gehalte keine Unterschiede zum Wildtyp ermittelt werden (Abbildung 14). Die im Kallusgewebe der T1-Generation bzw. in 21 Tage jungen Pflanzen der T2-Generation reduzierte PFP-Aktivität sowie *PFP*-Expression spiegelten sich nicht bei den Messungen der entsprechenden adulten Pflanzen der T1- bzw. T2-Generation wider, bei denen keine signifikante Reduktion der PFP-Aktivität beobachtet werden konnte. Aus diesen Daten könnte geschlussfolgert werden, dass die PFP bei Reis im jungen Gewebe bzw. Kallus tendenziell eine deutlich wichtigere Rolle zu spielen scheint als in adulten Pflanzen. Die mögliche Ursache für diese Diskrepanz könnte daran liegen, dass die PFP in jüngeren metabolisch aktiven Geweben eine wichtigere Funktion hat und sie ihre Bedeutung mit zunehmendem Alter der Pflanze zu verlieren scheint (Stitt, 1998). Eine weitere Erklärung für diese Diskrepanz wäre, dass sich das untersuchte autotrophe Blattgewebe sehr stark von dem heterotrophen Kallusgewebe unterschied. Zukünftige Versuche könnten sich deshalb auf die Untersuchung von heterotrophen Wurzelgewebe konzentrieren.

Entwicklungsbedingt können junge Gewebe, besonders jene, die nicht photosynthetisch aktiv sind und eine hohe metabolische Rate aufweisen, unter Sauerstoffmangel leiden. Die Wurzel ist ein heterotrophes Gewebe, und selbst bei 21 % Sauerstoff konnte in der Stele der Wurzel und dem Wurzelmeristem eine Verringerung der Sauerstoffkonzentration auf 1 % beobachtet werden (Armstrong und Beckett, 1985; Armstrong et al., 1994). Daneben wird durch die biosynthetischen Prozesse beim rapiden Wachstum dieser jungen Gewebe eine große Menge PPI für die Zelle bereitgestellt. So ist die Proteinaktivität und Proteinmenge der PFP in zahlreichen Spezies in jungen Geweben erhöht und verringert sich mit dem Älterwerden der untersuchten Pflanzen bzw. Gewebe, während die PFK an Aktivität und Bedeutung zunimmt (Nakamura et al., 1992; Ashihara und Sato, 1993; Hajirezaei et al., 1994; Nielsen und Wischmann, 1995; Groenewald und Botha, 2008). Bei Reis konnte unter Sauerstoffmangel

eine erhöhte PFP-Aktivität in Suspensionskulturen (Mohanty et al., 1993) und Koleoptilen (Mertens, 1991; Kato-Noguchi, 2002) beobachtet werden, wohingegen in dieser Arbeit nach 24 Stunden anoxischer Behandlung keine Induktion der PFP-Aktivität in Blättern nachgewiesen werden konnte. Bei dem untersuchten Gewebe handelte es sich jedoch um 2 Monate altes autotrophes Blattgewebe (Abbildung 11 B, Abbildung 14), während die erhöhte PFP-Aktivität vor allem in deutlich jüngeren bzw. heterotrophen Geweben ermittelt wurde (Mertens, 1991; Nakamura et al., 1992; Mohanty et al., 1993; Kato-Noguchi, 2002). Daraus könnte geschlussfolgert werden, dass die im jungen Gewebe bzw. Kallus beobachteten Unterschiede aufgrund der absinkenden physiologischen Relevanz des Proteins für die Pflanze während des Älterwerdens ausblieben.

Zudem kann die unter optimalen Bedingungen *in vitro* gemessene Aktivität, bei der alle Aktivatoren und Substrate im Überschuss vorhanden sind, sich stark von der *in vivo* Aktivität unterscheiden. So sind in den jeweiligen Entwicklungsstadien auch die Konzentrationen regulatorischer Moleküle sowie Substrate und Produkte, die die Enzymreaktion beeinträchtigen könnten, von entscheidender Bedeutung. Ashihara und Sato (1991) bestimmten die Gehalte von Fru2,6BP sowie ATP in unterschiedlich alten Hypokotyl-Geweben von *Vigna mungo*. Die Menge des PFP-Aktivators Fru2,6BP reduzierte sich mit zunehmendem Alter um 90 %, während sich die Menge von ATP, einem starken Inhibitor der PFK, auf 30 % verringerte. Somit stellt sich die Frage der grundsätzlichen physiologischen Relevanz dieses Proteins für die Pflanze. Theodorou und Kruger (2001) versuchten dieses Problem anzugehen. Dabei kamen sie in ihrer Studie zu dem Schluss, dass die Affinität des PFP-Enzyms durch physiologische Mengen anorganischen Phosphates soweit verändert wird, dass bereits beschriebene stress- oder entwicklungsspezifische Konzentrationsschwankungen von Fru2,6BP innerhalb der Pflanze die Aktivität des Enzyms beeinflussen können (Theodorou und Kruger, 2001).

4.1.2 Die Bedeutung der PFP für das Überleben von *Arabidopsis thaliana* bei Überflutung

Neben der PFP des monokotyledonen Modellorganismus Reis wurde auch die PFP der dikotyledonen Pflanze *Arabidopsis thaliana* zur funktionellen Analyse bei Sauerstoffmangel und Überflutung untersucht. Dazu wurden für die vier *Arabidopsis thaliana* PFP-Gene jeweils mindestens eine T-DNA-Insertionsmutante identifiziert (Abbildung 15 A), homozygote Individuen mit partiell bzw. komplett reduzierter PFP-Expression selektiert (Abbildung 15 B), die PFP/PFK-Aktivität bestimmt und die Metabolitgehalte des primären Stoffwechsels sowie

die Überlebensrate bei Überflutung gemessen. Während bei den unabhängigen T-DNA-Linien *pfpa1-1*, *pfpa1-2* und *pfpβ1-1* die PFP-Aktivität im Durchschnitt um 65 % reduziert war, konnte bei den T-DNA-Linien *pfpa2-1*, *pfpβ2-1* und *pfpβ2-2* keine Aktivitätsverringering beobachtet werden. Parallel wurde die PFK-Aktivität bestimmt. Hier sollte überprüft werden, ob die reduzierte PFP-Aktivität durch eine erhöhte PFK-Aktivität kompensiert wurde, dabei konnte bei den T-DNA-Insertionsmutanten mit reduzierter PFP-Aktivität *pfpa1-1*, *pfpa1-2* und *pfpβ1-1* keine gesteigerte PFK-Aktivität bestimmt werden (Abbildung 15 C). Hierzu gibt es in der Literatur teilweise sehr widersprüchliche Ergebnisse. So haben Lim et al. (2009) RNAi-Konstrukte der *PFPα1*- und *PFPβ1*-Gene hergestellt. Übereinstimmend mit den im Rahmen dieser Promotion ermittelten Werten (Abbildung 15 C) war bei Lim et al. (2009) die PFP-Aktivität der RNAi-PFPα1 um 47 % und die der RNAi-PFPβ1 um 37 % reduziert. In einer kürzlich veröffentlichten Studie untersuchten Lim et al. (2014) T-DNA-Insertionsmutanten der vier PFP-Gene. Korrespondierend mit ihrer früheren Studie verursachte bei den *PFPα*-Genen die *pfpa1*, jedoch nicht die *pfpa2* eine 50 %ige Verringerung der PFP-Aktivität. Konträr zu der vorherigen Veröffentlichung von 2009 und den in dieser Arbeit ermittelten Werten verursachte nicht die Deletion des *PFPβ1*-, sondern die des *PFPβ2*-Gens eine Reduktion der PFP-Aktivität von ca. 50 % (Lim et al., 2009, 2014). Für die beiden unabhängigen homozygoten T-DNA-Linien *pfpβ2-1* und *pfpβ2-2* konnte jedoch keine Verringerung der PFP-Aktivität beobachtet werden (Abbildung 15 C). Jedoch ist der von Lim et al. (2009) für das RNAi-Konstrukt verwendete Bereich in beiden *PFPβ*-Genen besonders stark konserviert und die Autoren versäumten es, die alleinige Spezifität für das PFPβ1 RNAi-Konstrukt nachzuweisen, indem sie lediglich die *PFPβ1*- aber nicht die *PFPβ2*-Transkriptmenge analysierten.

Unter Standardbedingungen verursachten die *PFPα1*- und *PFPβ1*-RNAi eine komplette Inhibition der jeweiligen PFP-Expression und eine im Durchschnitt 40 %ige Reduktion der PFP-Aktivität. Die *PFPα1*- und *PFPβ1*-RNAi wiesen allgemeine Wachstumsdefekte wie geringeres Frischgewicht und einen verringerten Rosettendiameter auf, eine massive Veränderung der Glucose-, Fructose-, Saccharose- und Stärkegehalte konnte jedoch nicht bestimmt werden (Lim et al., 2009). Unter Verwendung von T-DNA-Insertionsmutanten stellten Lim et al. (2014) Doppelmутanten der beiden *PFPα*- bzw. *PFPβ*-Gene sowie eine Quadrupelmutante her. Bei den *pfpa*- und *pfpβ*-Doppelmутanten war die PFP-Aktivität um ca. 80 % verringert, die Quadrupelmutante wies nur noch 3,5 % der wildtypischen Aktivität auf. Unter salinem Stress konnte lediglich bei Keimlingen der Quadrupelmutante ein Wachstumsretardation beobachten werden, während Keimlinge sowohl der beiden Doppelmутanten als auch der Quadrupelmutante im Vergleich zum Wildtyp sensitiver auf osmotischen Stress reagierten (Lim et al., 2014). Während Lim et al. (2009) schon bei den RNAi-Linien RNAi-PFPα1 und RNAi-PFPβ1 Wachstumsretardation beobachteten, konnten die Autoren 2014 selbst bei den Doppelmутanten und der Quadrupelmutante unter

Kontrollbedingungen keine signifikanten phänotypischen Unterschiede zum Wildtyp feststellen. Auf diese sehr widersprüchlichen Daten gehen die Autoren jedoch nicht ein (Lim et al., 2009, 2014).

Nach 24 bzw. 48 Stunden Überflutung verursachten die in dieser Arbeit untersuchten Einzel-PFP-Insertionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp keine signifikanten Unterschiede bei der Metabolitverteilung des Kohlenhydratmetabolismus (Abbildung 16) und wiesen nach 3 bzw. 4 Wochen Überflutung keine Veränderung bei der Überlebensrate oder dem Phänotyp auf (Abbildung 17 A, B und Anhang, Abbildung 41). So scheint bislang die PFP keine physiologische Relevanz für die Überflutungstoleranz von *Arabidopsis thaliana* zu haben. Das korreliert ebenfalls mit der Tatsache, dass im Gegensatz zu Reis die *PFP*-Gene von *Arabidopsis thaliana* unter Sauerstoffmangel nicht induziert werden (Mustroph et al., 2010, 2013). Da jedoch *Arabidopsis thaliana* jeweils zwei unterschiedliche β - bzw. α -Untereinheiten kodiert, könnte bei den bislang untersuchten Einzelmутanten das jeweils nicht deletierte *PFP α* - bzw. *PFP β* -Gen für Kompensation sorgen. Deshalb wurden anschließend *pfp α 1-1* \times *pfp α 2-1*- und *pfp β 1-1* \times *pfp β 2-1*-Doppelmутanten hergestellt, die nur noch 4 % der wildtypischen PFP-Aktivität aufwiesen (Abbildung 18 B). Die annähernd komplette Inhibition der PFP-Aktivität wurde nicht durch eine erhöhte PFK-Aktivität ausgeglichen (Abbildung 18 B) und bislang konnte bei den Doppelmутanten im Keimlingstadium kein unmittelbar phänotypischer Unterschied zum Wildtyp beobachtet werden (Abbildung 18 C). Die physiologische Relevanz dieser Doppelmутanten bei Überflutung verbleibt noch zu klären.

4.1.3 Die physiologische Relevanz der PF2K bei Überflutung

Der Metabolit Fru2,6BP ist in allen eukaryotischen Organismen ein Schlüsselenzym des primären Kohlenhydratmetabolismus. In Pflanzen ist er in der Lage, die PFP zu aktivieren und die cFBPase zu inhibieren (Cséke et al., 1982b). Studien mit transgenen Pflanzen oder Mutanten fokussierten sich auf den Kohlenhydratstoffwechsel während der Photosynthese in *sink*-Gewebe. Pflanzen wie *Nicotiana tabacum*, *Kalanchoe daigremontiana*, *Arabidopsis thaliana* und *Solanum tuberosum* mit reduzierten bzw. erhöhten Fru2,6BP-Mengen zeigten vor allem photosynthetisch bedingte Veränderungen bei der Zusammensetzung der Zucker (Scott und Kruger, 1995; Truesdale et al., 1999; Scott et al., 2000; Draborg et al., 2001; Rung et al., 2004). So verursachte die Reduktion von Fru2,6BP in *Arabidopsis thaliana* eine Akkumulation von Saccharose, Glucose und Fructose, während Triosephosphate bei der Mutante im Vergleich zum Wildtyp in geringeren Mengen vorlagen (Draborg et al., 2001). Weil Fru2,6BP ein Schlüsselregulator der photosynthetisch bedingten

Verteilung von Kohlenhydraten ist, wurde seine Funktion auch unter suboptimalen Wachstumsbedingungen analysiert. Bei Phosphatmangel konnten in *Brassica nigra*-Zellen verschiedene PFP-Isoformen detektiert werden. Die veränderte Untereinheitenzusammensetzung resultierte in einer höheren Affinität der PFP zu ihrem Aktivator Fru2,6BP, und die Reaktion in Richtung der Glycolyse wurde bevorzugt (Theodorou et al., 1992; Theodorou und Plaxton, 1994, 1996). Das Reis-Genom kodiert für vier verschiedene regulatorische α -Untereinheiten, von denen die *OsPFP α 3* bei Hypoxie induziert wird und die restlichen drei herunterreguliert werden (Mustroph et al., 2013). Ebenfalls konnten in den Blättern der Mangrove *Bruguiera gymnorhiza* und *Sorghum bicolor* bei Trocken-, Salz- und osmotischem Stress sowohl ein erhöhter Fru2,6PB-Gehalt als auch eine induzierte PF2K-Aktivität beobachtet werden (Reddy, 1996; Banzai et al., 2003).

Zwar wird bei Sauerstoffmangel die Expression des *PF2K*-Gens in *Arabidopsis thaliana* nicht induziert, jedoch akkumuliert Fru2,6BP in hypoxischen Geweben von *Oryza sativa* Keimlingen, *Daucus carota* sowie *Euglena gracilis* (Enomoto et al., 1990; Mertens et al., 1990; Kato-Noguchi und Watada, 1996). Die Untersuchung der zwei unabhängigen T-DNA-Insertionsmutanten *pf2k-1* und *pf2k-2* ergab bislang, dass die teilweise bis komplette Inhibition der Genexpression (Abbildung 19 B) bei den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp unter Standardbedingungen und Sauerstoffmangel keine Veränderung in der PFP-Aktivität verursachte (Abbildung 19 C). Des Weiteren zeigen die Pflanzen nach vier Wochen kompletter Überflutung und einer Woche Regeneration keinen phänotypischen Unterschied zum Wildtyp (Abbildung 19 D). Die Deletion des *PF2K*-Gens scheint zu mindestens bei *Arabidopsis thaliana* bei Sauerstoffmangel keine überlebenswichtige Funktion zu haben. Wie stark sich der Fru2,6BP-Gehalt in den Mutanten unter Normalbedingungen bzw. bei Sauerstoffmangel verändert, muss noch untersucht werden. Obwohl die Akkumulation von Fru2,6BP bei Sauerstoffmangel bereits für einige Spezies nachgewiesen wurde, sind bislang keine Daten über den Gehalt dieses Metabolits bei Hypoxie in *Arabidopsis thaliana* bekannt.

4.2 Die Überflutungstoleranz vermittelnde Rolle der PFP in *Oryza sativa* und *Arabidopsis thaliana*

Bei einer Gegenüberstellung verschiedener Microarray-Daten konnten Mustroph et al. (2013) zeigen, dass die Expression der PPI-abhängigen Enzyme in der überflutungstoleranten Spezies Reis im Vergleich zur intoleranten Spezies *Arabidopsis thaliana* deutlich stärker war. Reis ist eine der wenigen Pflanzen, die unter Sauerstoffmangel im Dunkeln keimen können (Alpi und Beevers, 1983). Zahlreiche Studien zeigten, dass die PPI-abhängigen Enzyme bei Reis unter Hypoxie stark induziert sind (Mertens et al., 1990; Ricard et al., 1991; Moons et al.,

1998; Lasanthi-Kudahettige et al., 2007). Anhand von Mutanten sind diese Proteine in *Arabidopsis thaliana* funktionell am tiefgreifendsten charakterisiert, dabei verursachten die Mutanten unter verschiedenen Stressbedingungen lediglich einen leicht bis moderat veränderten Phänotyp (Bieniawska et al., 2007; Lim et al., 2009; Ferjani et al., 2011, 2012; Lim et al., 2014; Eastmond et al., 2015). Übereinstimmend mit diesen Studien konnte bei den *Arabidopsis* PFP-Einzelmutanten bei Sauerstoffmangel und Überflutung keine phänotypische oder metabolische Veränderung beobachtet werden (Abbildung 16, Abbildung 17 A und B, Anhang, Abbildung 41). Bei den *Arabidopsis thaliana* *pfpα*- und *pfpβ*-Doppelmutanten konnte trotz einer 96 %igen Reduktion der PFP-Aktivität bislang zumindest in jungen Keimlingen kein offensichtlich veränderter Phänotyp beobachtet werden (Abbildung 18 B und C), während die PFP-Aktivität der PFPβ T-DNA-Insertionsmutante komplett inhibiert ist und die Pflanze einen letalen Phänotyp hat (Abbildung 3).

Das bei Sauerstoffmangel auftretende Energiedefizit führt mit der Zeit sowohl bei Pflanzen als auch bei Tieren zum Verlust der Zellintegrität (Kroemer et al., 1998; St-Pierre et al., 2000; Felle, 2005). Unter normoxischen Bedingungen ist der Erhalt des Protonengradienten innerhalb der Zelle durch die ATP-Versorgung aus der oxidativen Phosphorylierung problemlos gewährleistet (Abbildung 36 A). Da die Pflanze lediglich limitierte Kohlenhydratreserven besitzt, führt anhaltender hypoxischer Stress dazu, dass der Energiestatus für die Pflanze immer kritischer wird. Das komplette Ausschöpfen der Energiereserven resultiert in einem Zusammenbruch des Protonengradienten, woraufhin es zum unkontrollierten Austritt von Protonen in das Cytosol kommt (Felle, 2005) (Abbildung 36 D). Die Nutzung der alternativen Energiequelle P_{Pi} erhöht unter hypoxischen Bedingungen die Energieeffizienz der Zelle. Wenngleich die PFP und die PPDK P_{Pi} als alternativen Energiedonor nutzen, sparen die Reaktionen der Zelle in glycolytischer Richtung kaum Energie. In Verbindung mit ihrem ATP-abhängigen Konterpart bilden sie jedoch die zwei P_{Pi}-abhängigen PK/PPDK- und PFK/PFP-Substratkreisläufe, die in den letzten Jahren zur Debatte standen (Huang et al., 2005; Igamberdiev und Kleczkowski, 2011; Chen und Chen, 2014; Mustroph et al., 2014). Diese Kreisläufe sind in der Lage, P_{Pi} für die Zelle bereitzustellen. Während bei Hypoxie die P_{Pi}-produzierenden biosynthetischen Prozesse eingeschränkt werden (van Dongen et al., 2009; Mustroph et al., 2009, 2010), wurde in Gegensatz dazu berichtet, dass der P_{Pi}-Gehalt in der Zelle konstant bleibt (Mustroph et al., 2005). Unter anoxischen Bedingungen ist die PPDK in Reis 365-fach induziert (Lasanthi-Kudahettige et al., 2007). Da die PK kein ratenlimitierendes Enzym der Glycolyse ist, scheint die PPDK-Induktion nur einen Sinn zu machen, wenn dadurch der PK/PPDK-Substratzzyklus entsteht. Unter anderem schlussfolgerten Huang et al. (2005), dass dieser Zyklus zusätzliches P_{Pi} für die UGPase sowie die vPPase und PFP bereitstellt (Huang et al., 2005; Igamberdiev und Kleczkowski, 2011). Infolge dessen wird der SuSy/UGPase-Reaktionsweg, der pro

metabolisierter Saccharose ein PPI verbraucht und dadurch 2 ATP spart, mit PPI versorgt, während die vPPase die Acidose des Cytosols verhindert.

Mit einsetzender Hypoxie besitzt die Pflanze noch viele Kohlenhydratreserven. Unter der Annahme, dass die PFK ein Durchfluss limitierendes Enzym der Glycolyse ist (El-Mansi et al., 2011; Plowman und Smith, 2013; Hatch und Boardman, 2014), könnte unter diesen Bedingungen die PFP in Richtung der Glycolyse arbeiten, die Gesamt-Glycolyserate der Pflanze erhöhen und damit den bei Reis und vielen anderen Pflanzen beobachteten Pasteur-Effekt erklären (Gibbs et al., 2000; Summers et al., 2000; Mustroph et al., 2006) (Abbildung 36 B). Bereits gezeigt wurde, dass in Reis-Pflanzen bei Sauerstoffmangel die PFP-Aktivität und *PFP*-Expression induziert wird und sich zudem die Konzentration des Aktivators Fru2,6BP in Geweben verdreifacht (Mertens, 1991; Mustroph et al., 2013), während der Gehalt des Inhibitors PPI konstant bleibt (Mustroph et al., 2005). Ein wichtiger Faktor ist zudem, dass in anoxischem Gewebe durch den zunehmenden Verbrauch von ATP immer mehr Mg^{2+} freigesetzt wird (Igamberdiev und Kleczkowski, 2001). Durch die kontinuierlich steigende Mg^{2+} -Konzentration bilden sich immer mehr Mg_2PPI -Komplexe, die für PPI-abhängige Enzyme als Substratkomplex und nicht als Inhibitoren fungieren können (Leigh, 1993).

Mit andauernder Überflutung werden die Kohlenhydratreserven in der Zelle knapp (Colmer et al., 2001; Mustroph et al., 2006). Unter Bedingungen, bei denen freies, in Richtung der Gluconeogenese inhibitorisch wirkendes PPI verringert wird und zudem die ADP-Menge und der Pi-Gehalt, der Inhibitor der glycolytischen Reaktion der PFP, konstant bleiben bzw. steigen (Raymond und Pradet, 1980; Nanos und Kader, 1993; van Dongen et al., 2003; Mustroph et al., 2005), könnte die PFP die Richtung der Gluconeogenese bevorzugen (Abbildung 36 C). Dies würde auch den durch Colmer et al. (2001) beobachteten Effekt erklären, dass in Reiskeimlingen nach 60 Stunden Sauerstoffmangel die Produktion von Ethanol und somit die Glycolyse-Rate signifikant reduziert war.

Die Flexibilität dieses Enzyms, seine Reaktionsrichtung den jeweiligen Bedürfnissen der Zelle anzupassen, würde auch die in der Literatur oft gegensätzlichen Aussagen erklären, nach denen es sich bei der PFP um ein Enzym handle, das eher eine glycolytische Funktion hat bzw. eher in Richtung der Gluconeogenese arbeitet. Eine Hypoxie-bedingte Feinregulation der *PFP*-Expression und die damit eventuelle Veränderung der Isoformen ermöglichte bei Reis potentiell die erhöhte Toleranz bei Überflutung. Ob die Inhibition dieser Feinregulation bei Reis jedoch zur Letalität führt, ist fraglich.

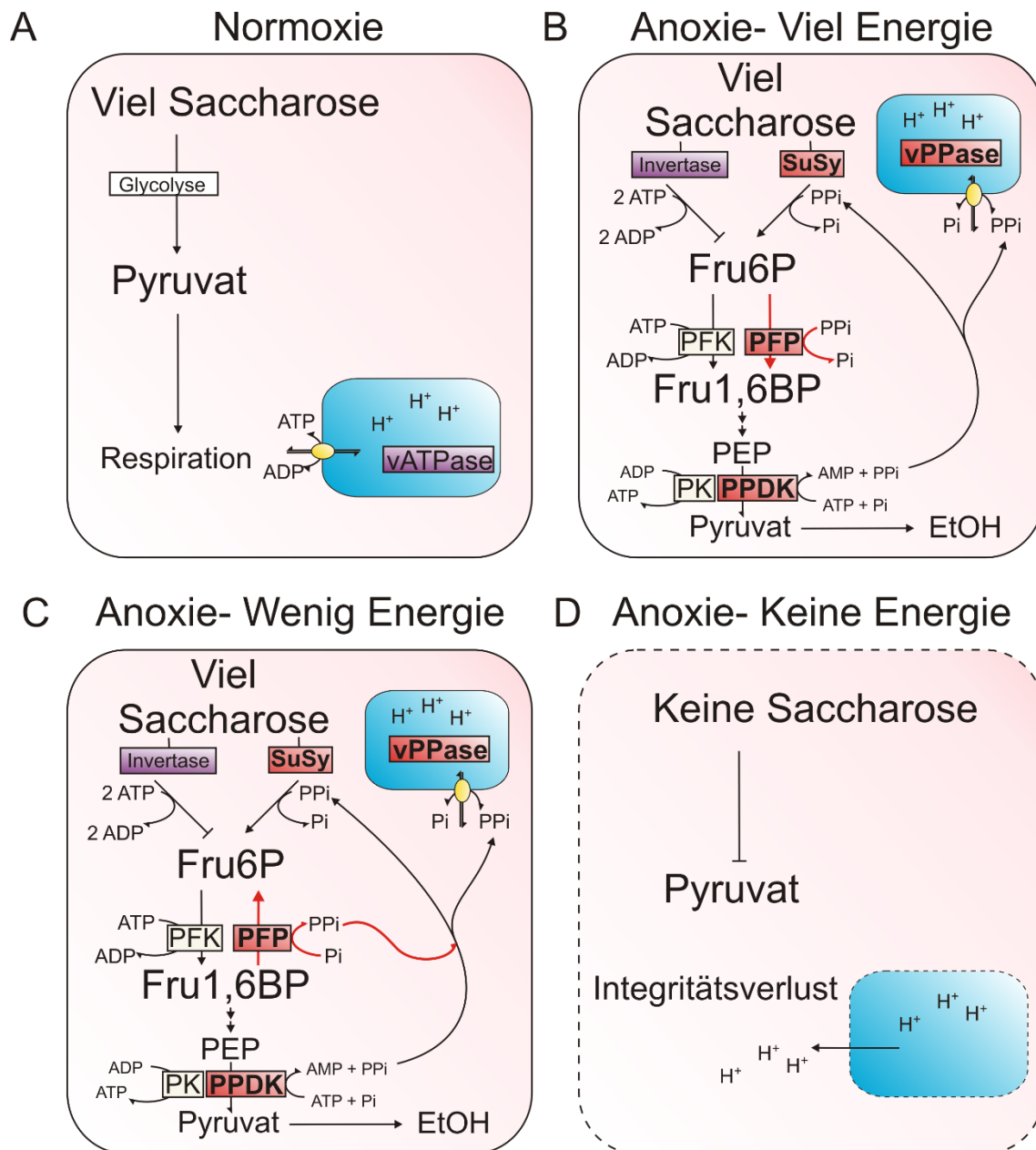


Abbildung 36: Mechanismus der Proteinregulation von PP-abhängigen Enzymen im Verlauf einer Sauerstoffmangel-bedingten Energiekrise bei *Oryza sativa*. Die Darstellung ist nach Atwell et al. (2015) sowie Igamberdiev und Kleczkowski (2011) abgeleitet. (A) Bei Normoxie wird der Energiebedarf über die oxidative Phosphorylierung gedeckt. (B) Mit einer hypoxisch bedingten Energiekrise erfolgt die Induktion der PPi-abhängigen Enzyme (rot unterlegt), während die ATP-abhängigen Enzyme Invertase und vATPase inhibiert werden (lila unterlegt). Energie wird aus der Glycolyse gewonnen, während über die Fermentation das NADH regeneriert wird. Die Erhaltung des Protonengradienten erfolgt zunehmend über die vPPase. (C) Der anhaltende Sauerstoffmangel resultiert in einer Verknappung der Energiereserven. Potenzielle Veränderungen der cytoplasmatischen Zusammensetzung favorisieren bei der PFP die Richtung der Gluconeogenese. Es wird zusätzliches PPi für den Erhalt der Zellintegrität bereitgestellt. (D) Der Zelltod erfolgt durch den Zusammenbruch des Protonengradienten aufgrund der Erschöpfung von Kohlenhydratreserven innerhalb der Pflanze (Felle, 2005).

Bislang untersuchte Pflanzen wie *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*, *Arabidopsis thaliana* und *Saccharum* spp. mit einer teilweisen bis fast kompletten Inhibition der PFP-Aktivität zeigten unter Standardbedingungen sowie unter salinem oder osmotischem Stress (Hajirezaei et al., 1994; Paul et al., 1995; Groenewald und Botha, 2008; Lim et al., 2009, 2014) keine gravierenden Wachstumsretardationen. Somit hatte die PFP zumindest in diesen Organismen keine lebensnotwenige Funktion. Diese Pflanzen sind jedoch Überflutungsintolerante Spezies, während eine Studie mit Überflutungstoleranten Pflanzenspezies wie Reis oder *Oryza sativa* noch nicht veröffentlicht wurde. Bei diesen Spezies könnten die PPI-abhängigen Enzyme für das langfristige Überleben bei Überflutung eine deutlich wichtigere Rolle spielen.

4.3 Die Rolle der PFKs bei Sauerstoffmangel

Die durch hypoxische Bedingungen hervorgerufene biochemische und physiologische Umgestaltung innerhalb der Pflanze spiegelt sich ebenfalls auf transkriptioneller Ebene wider. Die Expression von Genen der Fermentation, von Enzymen der Glycolyse und vielen Transkriptionsfaktoren wird induziert (Christianson et al., 2010; Narsai et al., 2011). So identifizierten Mustroph et al. (2009) eine Gruppe von 49 Genen, deren Translation in allen Zelltypen von *Arabidopsis thaliana* bei Hypoxie verstärkt wird. Viele dieser Gene gehören zu einer evolutionär konservierten Antwort auf Sauerstoffmangel (Mustroph et al., 2009, 2010). Dazu zählen auch die ADH und PDC, deren Expression bei Hypoxie speziesübergreifend hochreguliert wird, sodass diese deshalb in den Pflanzen zwei ausgezeichnete biochemische und molekularbiologische Marker für Sauerstoffmangel darstellen. In *Arabidopsis thaliana* und Reis gibt es mehrere PFKs, deren Expression bei Hypoxie hochreguliert wird (Abbildung 2). Die Expression der *PFK3* und *PFK6* aus *Arabidopsis thaliana* korrespondiert bei Sauerstoffmangel mit dem Expressionsmuster der *PDC1* (Abbildung 21). Die als null-Mutanten identifizierten T-DNA-Insertionslinien der *PFK1*, 2, 3, 4, 6, 7 (Abbildung 22) verursachten nach hypoxischer Behandlung im Keimlingstadium keine Veränderung der PFK-Aktivität (Abbildung 23). So ist es wahrscheinlich, dass die analysierten *Arabidopsis thaliana* PFKs eine funktionale Redundanz aufweisen. Aus diesem Grund wurde von den zwei bei Sauerstoffmangel induzierten PFKs, *PFK3* und *PFK6*, eine Kreuzung der T-DNA-Mutanten durchgeführt. Die *pfk3* x *pfk6* Doppelmutante verursachte bei Sauerstoffmangel und bei Überflutung keine Verschiebung der Metabolitverteilung oder Veränderung der PFK-Aktivität (Abbildung 24).

Da bislang keine T-DNA-Insertionsmutante für die *PFK5* identifiziert werden konnte, wurde eine konstitutive RNAi der *PFK5* in *Arabidopsis thaliana* hergestellt. In ausgewählten

homozygoten Linien der T3-Generation konnte in 7 Tage alten Keimlingen eine reduzierte *PFK5*-Transkriptmenge und PFK-Aktivität ermittelt werden (Abbildung 25). Die Pflanzen unterschieden sich nach 7 Tagen im Keimlingstadium sowie nach 5 Wochen als adulte Pflanzen auf Erde phänotypisch nicht vom Wildtyp (Anhang, Abbildung 43).

Obwohl die Expression einiger PFKs bei Hypoxie induziert ist, scheint es durch Experimente mit Einzelmutationen der PFK1, 2, 3, 4, 6, 7 sowie der *pfk3* x *pfk6*-Doppelmutante und der PFK5 RNAi unwahrscheinlich, dass diese einzelnen Enzyme bei Sauerstoffmangel eine Funktion für das Überleben der Pflanzen haben bzw. dass sich die Enzyme gegenseitig ersetzen können. Bislang bleibt die Rolle der PFKs bei Sauerstoffmangel ungeklärt. Experimente mit Tripel- bzw. Quadrupelmutanten sind hier erforderlich.

Obwohl nicht unter Sauerstoffmangel induziert, ist die PFK2 von besonderem Interesse. Im Gegensatz zu allen anderen *Arabidopsis thaliana* PFKs war die Aktivität dieser PFK nach transienter Überexpression in Tabak nicht erhöht (Abbildung 28 und Mustroph et al., 2007). So könnte die PFK2 bei der Überexpression in Tabak weniger stabil sein und deshalb eine geringere Aktivität aufweisen. Potentiell könnte es sich bei dieser PFK auch um eine regulatorische Untereinheit handeln. Interessanterweise weicht die Exon- und Intron-Struktur dieser PFK stark von allen anderen PFKs ab (Abbildung 22 A). Mit zwei PFKs aus Reis bildet sie die eigenständige Untergruppe PFK_B (Abbildung 2). Aufgrund der Expressionsmuster ist es unwahrscheinlich, dass es sich bei diesen PFKs um Pseudogene handelt, da die Mitglieder dieser Gruppe im Vergleich zu anderen Geweben besonders stark im Samen bzw. Embryo exprimiert sind (Winter et al., 2007). So könnten diese PFKs für die Bereitstellung von Energie während der Embryoentwicklung wichtig sein. Jedoch zeigte die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte *pfk2* T-DNA-Insertionsmutante bei der Keimung unter Standardbedingungen mit 1 % [w/v] Saccharose im Medium keinen phänotypischen Unterschied zum Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Versuche mit der *pfk2*-Mutante unter suboptimalen Bedingungen, bei denen die Pflanzen in Dunkelheit oder ohne Saccharose zur Keimung gebracht werden, könnten zur Klärung der physiologischen Funktion dieser PFK beitragen.

4.4 Die Redox-Regulation der PFK5

Bisher publizierte Studien zeigten, dass die PFK5 und PFK2 aus *Arabidopsis thaliana* nach transienter Transformation in Tabak keine Aktivität aufwiesen (Mustroph et al., 2007). Eine erneute Sequenzierung ergab, dass in dem klonierten *PFK5*-Gen eine Mutation vorlag, die in einem Aminosäureaustausch resultierte. Das konservierte Glutamin an Position 553 wurde zur Glutaminsäure mutiert (Abbildung 26 B). Durch die erneute Klonierung der PFK5 konnte die PFK-Aktivität wiederhergestellt werden (Abbildung 26 A). Zur Kontrolle wurde ergänzend dazu

das konservierte Glutamin in der *PFK3* zur Glutaminsäure mutiert, diese Veränderung bewirkte einen kompletten Verlust der *PFK3*-Aktivität (Abbildung 26 A). Zur besseren Quantifizierung der transient in Tabak exprimierten *Arabidopsis thaliana* PFKs wurden zuerst ausgewählte PFKs mit einem HA-Tag markiert. Der Versuch, die ausgewählten PFKs N- bzw. C-terminal mit einem HA-Tag zu fusionieren, resultierte in einer signifikanten Minderung bis zur kompletten Inhibition der PFK-Aktivität. So verursachte die N-terminale Fusionierung des HA-Tags mit der *PFK3* bzw. *PFK5* eine 60 %ige Verringerung der *PFK3*-Aktivität (Abbildung 27 B) sowie eine komplette Inhibition der *PFK5*-Aktivität (Abbildung 27 F). Das Transit-Peptid der plastidär lokalisierten *PFK5* befindet sich am N-terminus des Proteins. Die N-terminal HA-Markierung verhinderte wahrscheinlich die korrekte Lokalisation der *PFK5* und verursacht somit die Inhibition der Aktivität. Daneben wurden die *PFK1*, 3, 6 und 7 C-terminal mit dem HA-Tag markiert. Obwohl alle C-terminal fusionierten PFKs im Vergleich zur nativen *PFK3* und der N-terminal markierten Version vergleichbar stark exprimiert wurden (Abbildung 27 E), resultierte die C-terminale Fusionierung im Vergleich zu *PFK3*-HA-N in einer deutlich verringerten Proteintranslation (Abbildung 27 C) und in einer kompletten Inhibition der PFK-Aktivität (Abbildung 27 D). Die epitope Markierung interferiert häufig mit der Proteinfaltung und bewirkte in allen im Rahmen dieser Arbeit HA-Tag markierten PFKs eine substantielle Reduktion der Proteinfunktionalität. Auf eine Verwendung von getaggten Proteinen wurde daher im weiteren Verlauf dieser Arbeit verzichtet.

4.4.1 Das Ferredoxin/Thioredoxin (TRX)-System der Chloroplasten

Um die Stabilität der Stoffwechselwege unter ständig wechselnden, teilweise sehr extremen Bedingungen zu gewährleisten, besitzen die Pflanzen verschiedene Regulationsmechanismen. Die posttranslationale Modifikation von Proteinen ermöglicht innerhalb von Minuten die Kontrolle dieser Stoffwechselwege. Grundsätzlich wird der photosynthetische Elektronentransfer in Chloroplasten zur Herstellung von NADPH und ATP und nachfolgend zur Assimilation von Zuckern verwendet. Ein Teil der Elektronen wird jedoch in die Redox-Signalisierung geleitet. Der Chloroplast ist ein Kompartiment, in dem die reversible Redox-Modifikation von Proteinen durch das Ferredoxin/Thioredoxin (TRX)-System bereits zahlreich nachgewiesen wurde (Lemaire et al., 2007; Michelet et al., 2013). So werden über den Reduktionsstatus die katalytischen Eigenschaften des Proteins reguliert (Scheibe et al., 1989; Scheibe, 1996; Ruelland und Miginiac-Maslow, 1999; Chibani et al., 2009). Das ausgeprägte TRX-System der Chloroplasten besteht aus zwei verschiedenen Ferredoxin Thioredoxin Reductasen (FTR) sowie der NADPH-abhängigen Thioredoxin Reductase C (NTRC), zahlreichen verschiedenen Typen an Thioredoxinen und Thioredoxin-ähnlichen

Proteinen (Nikkanen und Rintamäki, 2014). Bei dem TRX-System wird die photosynthetisch bedingte Reduktionskraft aus dem Photosystem 2 und 1 über eine Reduktionskaskade auf die Thioredoxine und das NTRC der Chloroplasten übertragen (Abbildung 37 A). Diese können durch die gerichtete Reduktion von regulatorischen Disulfid-Brücken die Aktivität von Zielproteinen wie z.B. der Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, ATPase, NADPH-Malatdehydrogenase (MDH) und FBPase (Johnson und Hatch, 1970; David W. McKinney, 1978, 1979; Jacquot et al., 1997; Reichert et al., 2000; Scheibe et al., 2002) modifizieren. Bei Nacht bzw. in Dunkelheit findet keine Photosynthese statt und die Reduktionskaskade wird unterbrochen. Die mangelnde Reduktionskraft resultiert in einer Oxidation der Zielproteine (Abbildung 37 B).

Chibani et al. (2009) betrachteten das TRX-System von *Populus trichocarpa* und fanden, dass von 46 Thioredoxinen aus diesem Organismus 22 in Chloroplasten lokalisiert sind oder ihr Import in dieses Kompartiment vorhergesagt wurde. Dabei sind die meisten Redox-regulierten Enzyme mit dem Kohlenhydrathaushalt der Chloroplasten assoziiert. So werden anabole Prozesse durch Licht gesteigert und katabole Vorgänge durch Licht inhibiert (Ruelland und Miginiac-Maslow, 1999; Chibani et al., 2009).

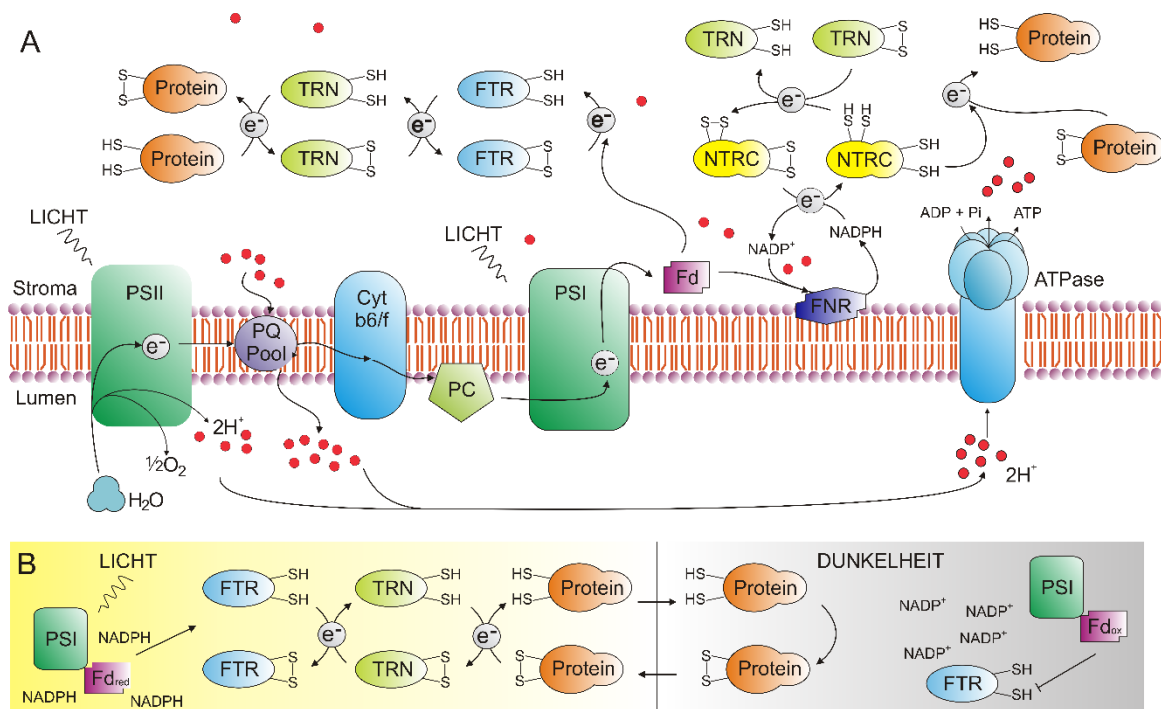


Abbildung 37: Das Thioredoxin-abhängige Redox-Netzwerk im Chloroplast. Bei Licht wird das Photosystem 2 (PSII) in der Thylakoidmembran durch die Lichtenergie angeregt. Das Chlorophyll im PSII überträgt im angeregten Zustand ein Elektron auf das Plastoquinon (PQ). Durch die Oxidation kann das Chlorophyll im Reaktionszentrum des PSII ein Elektron vom Wasser übernehmen, was zu einer Produktion von Sauerstoff und Protonen im Lumen führt. Das reduzierte PQ nimmt Protonen (H^+) vom Stroma auf, löst sich vom PSII und wird in der Thylakoidmembran zum Cytochrom (Cyt) b6/f-Komplex transloziert. Das PQ wird dann oxidiert, das Proton ins Lumen übertragen und das Elektron anschließend über den Cyt b6/f-Komplex und Plastocyanin (PC) zum Photosystem 1 (PSI) weitergeleitet. Das reduzierte Chlorophyll im PSI wird durch die Lichtenergie angeregt und gibt sein Elektron an das Ferredoxin (Fd) weiter. Hier werden die Elektronen einerseits über die Ferredoxin-NADP-Reductase (FNR) zum Reduzieren von NADP^+ benutzt. Andererseits werden die Elektronen an die Ferredoxin Thioredoxin Reductase (FTR) weitergeleitet. Die FTR reduziert Thioredoxin (TRN), welches die Zielproteine reduzieren kann. Die Reduktionskraft des entstandenen NADPH kann auch für die Reduktion von der NADPH-abhängigen Thioredoxin Reductase C (NTRC) verwendet werden. Die NTRC reduziert Zielproteine oder leitet die Elektronen an das TRN weiter. Der aufgebaute Protonengradient an der Thylakoidmembran wird zur Produktion von ATP über die ATPase verwendet. (B) Die Reduktionskraft der Photosynthese wird bei Licht über die Reduktionskaskade weitergeleitet und für die Reduktion der Disulfid-Brücken der Zielproteine verwendet. Bei Dunkelheit ist diese Kaskade inhibiert, was in einer Oxidation der Proteine resultiert (modifiziert nach Michelet et al., 2013; Nikkanen und Rintamäki, 2014).

Während die antioxidative Wirkung von Glutathion in Tieren, Pflanzen sowie Pilzen bekannt ist und viele Proteine bei oxidativem Stress einer Glutathionylierung unterliegen, wird seine Bedeutung für die Redox-Regulation erst zunehmend wahrgenommen (Scholz et al., 1989;

Dalle-Donne et al., 2009). Glutaredoxine sind kleine Oxidoreduktasen, die ein alternatives Redox-System zum TRX-System darstellen (Couturier et al., 2009). Die Lokalisation einiger Glutaredoxine im Chloroplasten wurde bereits bestätigt (Bandyopadhyay et al., 2008). Glutaredoxine können wie Thioredoxine intra- und intermolekulare Disulfid-Brücken reduzieren, indem sie ein gemischtes Disulfid aus Cystein und Glutathion bilden. Potentiell könnten sie eine wichtige Rolle in der Regulation des photosynthetischen Metabolismus spielen. Es ist bekannt, dass einige plastidäre Glutaredoxine in der Lage sind, Enzyme des Calvin Zyklus zu glutathionylieren (Ito et al., 2003; Zaffagnini et al., 2007); zudem wurde gezeigt, dass das plastidische Thioredoxin f nach Glutathionylierung inaktiviert wird und dies indirekt die Aktivität der NADP-MDH und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase beeinflusst (Michelet et al., 2005).

4.4.2 Die strukturellen Eigenschaften der PFK5

Im Laufe der Evolution hat sich der Cysteingehalt der Proteine zunehmend erhöht. Cysteine, die Disulfid-Brücken bilden, sind deutlich konservierter als jene, die nicht an der Redox-Regulation beteiligt sind (Wong et al., 2011; Balsera et al., 2012). Innerhalb der Familie der pflanzlichen PFKs sind mehrere Cysteine stark konserviert. Dabei bilden die Cysteine das CGG(L/I)C-Motiv (Abbildung 29 C) und das CXXXXC-Motiv (Abbildung 33 C). Zusätzlich kodieren die Aminosäuresequenzen der PFKs für mehrere einzelne stark konservierte Cysteine (Abbildung 31 D). Das CXXXXC-Motiv ist dadurch gekennzeichnet, dass die PFKs, die dieses Motiv kodieren, eine eigenständige phylogenetische Untergruppe bilden. Diese Gruppe I grenzt sich deutlich von den restlichen pflanzlichen und den Algen-PFKs ab und beinhaltet plastidär lokalisierte PFKs (Abbildung 20).

Ein Indiz für die mögliche Redox-Regulierung von Proteinen ist, dass verschiedenen Redox-Stadien bei diesen Proteinen eine Veränderung der Aktivität hervorrufen. So gibt es zahlreiche Proteine, die durch reduzierende Bedingungen aktiviert werden (Issakidis et al., 1992; Lemaire et al., 1996; Jacquot et al., 1997; Wendt et al., 2000). Um die potentielle Redox-Regulation der *Arabidopsis thaliana* PFKs zu untersuchen, wurden diese in Tabak überexprimiert und der Extrakt anschließend unter reduzierenden und unter oxidierenden Bedingungen analysiert (Abbildung 28). Während alle PFKs, bis auf PFK2, unter reduzierenden Bedingungen aktiv waren, resultierte die Oxidation der Extrakte mit Natriumtetrathionat in der Inhibition der PFK-Aktivität. Die Aktivität der PFK1, 3, 4, 6, und 7 war komplett inhibiert, wohingegen bei der PFK5 eine partielle Inhibition der PFK-Aktivität erfolgte. Die darauf folgende Reduktion der Extrakte resultierte in einer partiellen Wiederherstellung der Aktivität bei PFK1, 3, 4, 6, 7 und einer kompletten Regeneration der PFK5-Aktivität. Außer der reversiblen Oxidation von Cysteinen

wurde für Natriumtetrathionat bislang kein weiterer Reaktionsmechanismus nachgewiesen (Lundblad und Macdonald, 2010). Da die Enzymaktivität gegenüber Oxidation empfindlich war, konnte aus den Daten abgeleitet werden, dass eines der im Protein befindlichen Cysteine potentiell an einer Redox-abhängigen Regulation beteiligt ist.

Die am nächsten verwandte, bereits strukturell aufgeklärte PFK konnte durch sequenzvergleichende Analysen in dem nicht pflanzlichen Organismus *Trypanosoma brucei brucei* identifiziert werden. Diese PFK, wie auch alle *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* PFKs (Ausnahme OsPFK3), enthalten das sehr stark konservierte CGG(L/I)C-Motiv (Abbildung 29 C) sowie einige andere stark konservierte Cysteine (Abbildung 31 D). Die aus wildtypischen *Trypanosoma brucei brucei* Zellen isolierte PFK zeigte unter reduzierenden und unter oxidierenden Bedingungen ein mit den bislang analysierten *Arabidopsis thaliana* PFKs korrespondierendes Aktivitätsmuster. Die Oxidation des Extraktes resultierte in einer Inhibition der Aktivität, die durch eine erneute Reduktion partiell wiederhergestellt werden konnte (Abbildung 29 A). Um die *T. brucei brucei* PFK als Kontrolle zu verwenden, wurde eine Überexpression dieses Proteins in Tabak versucht, dabei konnte nach Infiltration in Tabak im Vergleich zu den Kontrollen keine erhöhte Aktivität beobachtet werden (Abbildung 29 B).

Eine Möglichkeit, die an der Regulation beteiligten Cysteine innerhalb der PFKs zu identifizieren, bot die zielgerichtete Mutagenese dieser Cysteine. So imitiert der Aminosäureaustausch von Cystein nach Serin an der entsprechenden Position in diesem Protein ein konstitutiv reduziertes Cystein. Die anschließende Untersuchung dieser Mutation ermöglicht die Identifikation gegenüber Thiolreagenzien sensibler Cysteine. Für die Analyse wurden die cytosolisch lokalisierte PFK3 und die plastidische PFK5 ausgewählt.

4.4.3 Das CGG(L/I)C-Motiv ist nicht an der Redox-abhängigen Regulation der PFKs beteiligt

Zuerst wurden Einzel- und Doppelmutationen der Cysteine des CGG(L/I)C-Motivs hergestellt. Während die nativen Proteine der PFK3 und PFK5, wie bereits gezeigt (Abbildung 28), unter reduzierenden Bedingungen aktiv waren und Oxidation zu einer partiellen bzw. kompletten Inhibition führte, verursachten die PFK5-C187S- und PFK3-C99S-Einzelmutationen des ersten Cysteins des CGG(L/I)C-Motivs unter oxidierenden Bedingungen im Vergleich zu dem jeweiligen wildtypischen Protein eine Induktion der PFK-Aktivität (Abbildung 30 A und C). Die Einzelmutation PFK5-C191S bzw. PFK3-C103S ist eine Mutation des zweiten Cysteins des CGG(L/I)C-Motivs und wies ein zum jeweiligen wildtypischen Protein korrespondierendes Aktivitätsmuster auf. Die Gesamtaktivität war für PFK3 bei jeder Mutation leicht reduziert und

für PFK5 halbiert (Abbildung 30 A und C). Dagegen verursachte die C187S-C191S-Doppelmutation des Motivs bei der PFK5 eine komplette Inhibition der Aktivität, während sich die C99S-C103S-Doppelmutation der PFK3 vergleichbar zur PFK3-C99S-Mutation verhielt (Abbildung 30 B und D). Aus den Daten lässt sich schlussfolgern, dass das erste Cystein des Motivs für die Empfindlichkeit des Proteins gegenüber Oxidation verantwortlich ist.

Grundsätzlich scheint das CGG(L/I)C-Motiv nicht an einer Disulfid-Brücke beteiligt zu sein. Obwohl die PFK3-C99S- bzw. PFK5-C187S-Mutation unter oxidativen Bedingungen konstitutiv aktiv war, konnte bei der Mutation des zweiten Cysteins des Motivs PFK3-C103S und PFK5-C191S bei Oxidation keine erhöhte PFK-Aktivität beobachtet werden. Deshalb wurden zusätzlich alle in proximaler Distanz gelegenen konservierten Cysteine zu Sterinen mutagenisiert (Abbildung 31 D und E). Das Ziel dieser Experimente war es, ein weiteres Cystein, dessen Mutation unter oxidierenden Bedingungen aktiv war, als Partner für eine Disulfid-Brücke mit dem PFK3-C99 bzw. PFK5-C187 zu identifizieren. Die PFK3-C95S- und PFK3-C390S-Mutationen sowie die PFK5-C373S- und PFK5-C375S-Mutationen hatten im Vergleich zum Wildtyp ein ähnliches Aktivitätsmuster, wobei die Aktivität bei den PFK5 Mutationen im Allgemeinen etwas reduziert war (Abbildung 31 A und C). Dagegen war die Aktivität der PFK3-C282S-C283S komplett inhibiert (Abbildung 31 B). Jedoch war keine der analysierten Mutationen unter oxidativen Bedingungen konstitutiv aktiv. Somit war keines der anderen konservierten Cysteine an einer Disulfid-Brücke mit dem Cystein PFK3-C99 bzw. PFK5-C187 beteiligt. Die leichte Aktivitätsverringerung bzw. Inhibition beruhte wahrscheinlich auf der, durch die Mutation hervorgerufenen, Konformationsänderung innerhalb des Proteins.

Des Weiteren zeigten die Doppelmutationen des CGG(L/I)C-Motivs bei der PFK5 und PFK3 inkonsistente Ergebnisse. Während sich die Doppelmutation des CGG(L/I)C-Motivs bei PFK3 wie die C99S-Einzelmutation verhielt und unter oxidativen Bedingungen aktiv war, verursachte die Doppelmutation des CGG(L/I)C-Motivs bei der PFK5 einen kompletten Verlust der Aktivität (Abbildung 30 B und D).

Vergleichbar mit den unter oxidierenden Bedingungen konstitutiv aktiven PFK3-C99S- bzw. PFK5-C187S-Einzelmutationen konnten Lemaire et al. (1996) bei der NADP-MDH eine ähnliche Beobachtung machen. Dabei identifizierten sie im aktiven Zentrum der NADP-MDH das Redox-sensitive Cystein an Position 175. Die Mutation dieses Cysteins resultierte in einer gegenüber einer Iodacetamid bedingten Oxidation unempfindlichen Form des Proteins. Die spezifische Aktivität des Enzyms war jedoch erhöht. Die Autoren schlussfolgerten, dass das Cystein nicht direkt an der Katalyse teilnimmt. Ausgelöst durch die Alkylierung des Cysteins wird die Iodacetamid-bedingte Inaktivierung des Wildtyps durch eine sterische Behinderung hervorgerufen. Die Modifikation dieses Cysteins im aktivem Zentrum verhindert die notwendige Konformationsänderung zur Bildung eines katalytischen Komplexes (Lemaire et

al., 1996). Bei zahlreichen Proteinen konnte eine Veränderung der Aktivität beobachtet werden, die auf der räumlichen Behinderung der durch Thiolreagenzien modifizierten Cysteine beruhte (Nishihira et al., 1992; Liu et al., 1999; Tremblay et al., 2001).

Vermutlich verursachte die Oxidation der Cysteine im aktiven Zentrum der PFK-Proteine eine sterische Behinderung des aktiven Zentrums, infolgedessen die katalytische Reaktion verhindert wurde. Durch die Natriumtetrathionat-bedingte Sulfenylation wurde eine Sulfur-Trioxid-Gruppe an das PFK3-C99 und an das PFK5-C187 addiert. Diese Sulfur-Trioxid-Gruppe war für die sterische Behinderung der ATP-Bindung verantwortlich. Das zweite Glycin des CGG(L/I)C-Motivs wird bei den bereits strukturell aufgeklärten PFKs von *E. coli* und *T. brucei brucei* mit der ATP-Bindung des Proteins in dem aktiven Zentrum assoziiert (Shirakihara und Evans, 1988; Martinez-Oyanedel et al., 2007; McNae et al., 2009), daher kann das benachbarte Cystein ebenfalls wichtig für die Enzymaktivität sein. Aus dem Mangel einer reaktiven Thiolgruppe ist die PFK3-C99S. und PFK5-C187S-Mutation gegenüber der Modifizierung durch Natriumtetrathionat unempfindlich, deshalb verbleibt bei diesen Mutationen selbst bei Oxidation eine Aktivität (Abbildung 30 A und C).

4.4.4 Das CXXXXC-Motiv ist in die Redox-abhängige Regulation der PFK5 involviert

Die PFK5 ist neben der PFK4 die einzige plastidär lokalisierte PFK. Während die PFK5 das plastidische CXXXXC-Motiv kodiert, ist es in der PFK4 nicht vorhanden. Eine sequenzvergleichende Strukturanalyse ergab, dass die PFK3, 4 und 5 zu 42 % mit dem bereits kristallisierten *T. brucei brucei* PFK-Apoenzym übereinstimmten. Anhand dieser Struktur wurde die Struktur der drei *Arabidopsis thaliana* PFKs vorhergesagt und grafisch dargestellt (Abbildung 32). Mit Ausnahme des CXXXXC-Motivs sind alle Cysteine innerhalb der Proteine verdeckt und werden zusätzlich durch die Oberfläche des Proteins maskiert. Somit sind sie für Enzyme der Redox-Regulation sehr schwer zugänglich. Die Cysteine des CXXXXC-Motivs sind dagegen in einer unstrukturierten, sehr flexiblen Proteinwindung in der Nähe des aktiven Zentrums des Proteins lokalisiert. Zudem befinden sich die Cysteine an der Oberfläche und sind deshalb besonders leicht für Redox-regulierende Proteine wie Thioredoxin zugänglich. Die Flexibilität der Schleife erlaubt keine präzise Angabe zur Distanz zwischen den beiden Cysteinen. Zusätzlich basiert die Strukturvorhersage auf der *T. brucei brucei* PFK, bei der einige Aminosäuren der Windung innerhalb der Sequenz nicht vorhanden sind. Deshalb ordnet das *phyre2*-Programm die Aminosäuren in diesen Bereich nach dem Prinzip des geringsten Energiewiderstandes. Somit wird von dem Programm für diesen Bereich eine relativ hohe

Protein-Unordnung vorhergesagt und die Sekundärstruktur kann teilweise nicht präzisiert werden (Anhang, Abbildung 44). Der geschätzte Abstand beträgt jedoch 8,8 Ångström, was für die Ausbildung einer Disulfid-Brücke zu lang wäre. Für die plastidäre ATP-Synthase wurde jedoch gezeigt, dass die Bindung des Thioredoxins an das Protein mit einer Konformationsänderung der γ -Untereinheit einhergeht, die erst die Reduktion der beteiligten Cysteine ermöglicht (Stumpp et al., 1999).

Zur weiteren Analyse wurden die Cysteine des CXXXXC-Motivs bei der PFK5 mutagenisiert. Dieses Motiv wird nur von PFKs der Gruppe I kodiert (Abbildung 20). Die C152S- und C157S-Einzelmutationen sowie die C152S-C157S-Doppelmutation verursachten sowohl unter reduzierenden als auch unter oxidierenden Bedingungen eine komplette Inhibition der PFK-Aktivität (Abbildung 33). Das ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die komplette Reduktion der Cysteine des CXXXXC-Motivs, wie sie durch die Serine imitiert wurde, in einem Aktivitätsverlust resultierte und diese Cysteine deshalb in die Redox-abhängige Regulation involviert waren. Bei *Solanum tuberosum* und *Arabidopsis thaliana* ist für die Regulation der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase eine C(X)₇C-Disulfid-Brücke verantwortlich (Wenderoth et al., 1997; Née et al., 2009). Korrespondierend mit der PFK5 ist eine Doppelmutation der zwei Cysteine bei der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase durch einen fast kompletten Aktivitätsverlust und eine Unempfindlichkeit gegenüber Redox-Modifikationen gekennzeichnet (Née et al., 2014).

Die Reduktion der Cysteine und der damit einhergehende Aktivitätsverlust konnten bei der nativen PFK5 aufgrund des experimentellen Aufbaus bei der bislang durchgeführten Standardmessung mit β -Mercaptoethanol und DTT nicht erreicht werden (Abbildung 33 A und B). Scheibe et al. (1986) zeigten, dass sich die Sensitivität der NADP-MDH gegenüber Reduktionmitteln mit zunehmend höherer ionischer Stärke und steigendem pH erhöht. Zudem konnte die NADP-MDH nur bedingt bei hoher ionischer Stärke von DTT aktiviert werden, während das Monothiol β -Mercaptoethanol selbst bei 700 mM Tris nicht in der Lage war, das Protein zu aktivieren (Issakidis et al., 1992). Aus diesem Grund wurde die Aktivität der in Tabak überexprimierten PFKs unter teilweise denaturierenden Bedingungen bei einem alkalischen pH mit 500 mM NaCl vermessen und zusätzlich mit DTT reduziert. Unter denaturierenden Bedingungen mit zusätzlicher Reduktion konnte lediglich eine Verringerung der PFK-Aktivität bei der PFK5 beobachtet werden. Dagegen waren die restlichen PFKs gegenüber der Reduktion unempfindlich (Abbildung 34 A). Bei der PFK5 wurde eine Verringerung der Aktivität von 53 % erzielt (Abbildung 34 B). Daraus kann geschlossen werden, dass unter den *Arabidopsis thaliana* PFKs nur die PFK5 Redox-sensitiv ist und die Reduktion dieses Proteins mittels DTT in einer teilweisen Inaktivierung resultiert. Zum Vergleich resultierte die

Behandlung von Blattextrakt mit DTT in einer 25 bis 35 %igen Reduktion der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität (Scheibe et al., 1989).

4.4.5 Die PFK5 Aktivität wird durch Licht inhibiert

Kachru und Anderson (1975) berichteten, dass *Pisum sativum*-Keimlinge, die mit Licht behandelt wurden, eine deutliche Verringerung der PFK-Aktivität aufwiesen. Daneben resultierte die Reduktion des Blattextraktes in einer kompletten Inhibition der PFK-Aktivität. Um die lichtabhängige Regulation der *Arabidopsis thaliana* PFK5 nachzuweisen, wurden Tabakpflanzen mit dem PFK5 Überexpressionskonstrukt transient transformiert, zuerst mit Licht bzw. Dunkelheit vorbehandelt und anschließend die Chloroplasten aus den Blättern extrahiert. Der Chloroplastenextrakt wurde danach wiederum zum einen Teil illuminiert, zum anderen Teil für 1 Stunde im Dunkeln inkubiert. Abhängig von der ATP-Konzentration konnte bei den mit Licht inkubierten Chloroplasten eine Verringerung der Aktivität von 66 bis 78 % beobachtet werden (Abbildung 35 A und B). Korrespondierend damit berichteten Heuer et al. (1982), dass aus *Pisum sativum* isolierte Chloroplasten, die zuerst mit Dunkelheit vorbehandelt und anschließend ins Licht transferiert wurden, eine Reduktion der PFK-Aktivität von 70 % aufwiesen. Zudem war die aus *Spinacia oleracea*-Chloroplasten isolierte PFK gegenüber dem Reduktionsmittel NADPH sensitiv. Physiologische NADPH-Konzentrationen inhibierten sehr stark die PFK-Aktivität und verringerten die Affinität des Enzyms zu seinen Substraten ATP und Fru6P (Cséke et al., 1982a). Als Kontrolle wurde die PFK4 verwendet, da diese ebenfalls in Chloroplasten lokalisiert ist, jedoch nicht das CXXXXC-Motiv kodiert. Da die Vorbehandlung der Tabak-Pflanze keinen Einfluss auf die Aktivität hatte (Abbildung 35 A und B), wurde bei der Analyse der PFK4 und bei der Pufferkontrolle auf die Vorbehandlung der Tabak-Pflanze verzichtet. Bei der PFK4 und der Pufferkontrolle konnte keine signifikante lichtbedingte Reduktion der PFK-Aktivität beobachtet werden (Abbildung 35 C und D).

Durch die Analyse der Aktivität bei verschiedenen ATP-Konzentrationen sollte eine mögliche Redox-abhängige Veränderung des K_m -Wertes untersucht werden. Beim Vergleich der Licht- und Dunkel-behandelten Chloroplasten konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch bei unterschiedlichen ATP-Konzentrationen keine Verschiebung des K_m -Wertes bei der PFK5 beobachtet werden. Dagegen konnten Cséke et al. (1982) bei der lichtregulierten PFK von *Spinacia oleracea* eine deutlich Erhöhung des K_m -Wertes gegenüber ATP und Fru6P beobachten.

4.4.6 Die PFK5 im Vergleich zur Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Pflanzen haben im Laufe der Evolution besonders in Chloroplasten ein ganzes System zur Licht-abhängigen Regulation von Proteinen entwickelt (Abbildung 38 A). Während die meisten Proteine durch Licht aktiviert werden und mit dem Calvin Zyklus assoziiert sind, ist bislang die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase das einzige durch Licht inaktivierte Enzym in diesem Kompartiment. Diese Regulation ist einhergehend mit der Funktion des Enzyms, das den initialen Reaktionsschritt des oxidativen Pentosephosphatwegs katalysiert und somit in den Katabolismus von Zucker involviert ist (Lemaire et al., 2007). Interessant ist, dass die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus *Solanum tuberosum* bzw. *Arabidopsis thaliana* und PFK5 viele Charakteristika teilen. Beide Proteine werden durch Licht inaktiviert und bei Dunkelheit aktiv (Abbildung 35 A und B) (Anderson und Duggan, 1976; Lendzian, 1980; Scheibe et al., 1989). Die Doppelmutation beider an der Redox-Regulation beteiligter Cysteine ist gegenüber Redox-Modifikation unempfindlich (Abbildung 33 A und B) (Née et al., 2014). Die an der Regulation beteiligte Cysteinstruktur ist in beiden Proteinen stark übereinstimmend (Abbildung 38 B und Abbildung 32 C). Die regulatorischen Cysteine beider Proteine sind auf einer flexiblen Windung an der Oberfläche des Proteins lokalisiert und somit für Redox-modifizierende Proteine leicht zugänglich (Abbildung 32 D) (Wenderoth et al., 1997; Née et al., 2009). Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase durch Thioredoxin f und m reguliert wird (Née et al., 2009). Somit ist es wahrscheinlich, dass die PFK5 in *Arabidopsis thaliana* einer Thioredoxin-abhängigen Regulation unterliegt.

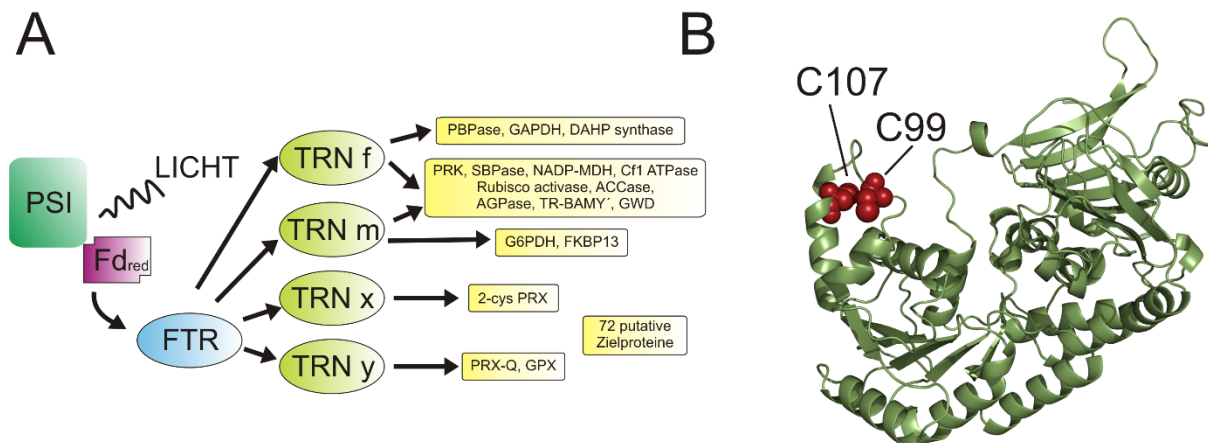


Abbildung 38: (A) Das Thiothredoxin-System in Chloroplasten (Lemaire et al., 2007). (A) Das reduzierte Chlorophyll im Photosystem (PSI) wird durch die Lichtenergie angeregt und gibt sein Elektron an das Ferredoxin (Fd) weiter. Hier werden die Elektronen an die Ferredoxin Thiothredoxin Reductase (FTR) weitergeleitet. Die FTR reduziert Thiothredoxin (TRN), welches die Zielproteine reduzieren kann. Vor der Einführung neuer proteomischer Techniken als Redox-regulierte identifizierte Ziel-Proteine: Fructose-1,6-Bisphosphatase, FBPase; Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, GAPDH; 3-desoxy-D-Arabin-Heptulosonat-7-Phosphat-Synthase, DAHP Synthase; Phosphoribulokinase, PRK; Sedoheptulose-1,7-Bisphosphatase, SBPase; NADP-Malatdehydrogenase, NADP-MDH; Cf1 ATPase; Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase Acitvase; RuBisCO Activase, Acetyl-CoA Carboxylase, ACCase; ADP-Glucose Pyrophosphorylase, AGPase; Thiothredoxin-abhängige Beta-Amylase, TR BAMY; Glukan-Wasser-Dikinase, GWD; Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase FKBP13, FKBP13; 2-Cystein Peroxiredoxin, 2-cys PRX; Peroxiredoxin Q, PRX-Q; Glutathion Peroxidase, GPX. Neue proteomische Ansätze ermöglichten die Identifizierung von weiteren 72 putativen Zielproteinen. (B) Dargestellt ist die Sekundärstruktur der Glucose 6-Phosphat-Dehydrogenase mit den, in die Redox-Regulation involvierten, Cysteinen an Position 99 und 107 (rot markiert).

Zusammenfassend konnte belegt werden, dass das CXXXXC-Motiv der PFK5 an der Licht-abhängigen Redox-Regulation innerhalb der Chloroplasten beteiligt ist. Die physiologische Relevanz dieser Regulation könnte darin begründet sein, dass bei Nacht der Stärkespeicher der Chloroplasten für die Energieversorgung der Pflanze verbraucht wird und eine aktive PFK5 sinnvoll ist. Bei Tag müssen die erschöpften Energiespeicher für die kommende Nacht nachgefüllt werden und dabei wäre eine aktive PFK5 kontraproduktiv. Dagegen spricht, dass zumindest bei *Arabidopsis thaliana* in der Nacht vorwiegend Maltose aus den Chloroplasten transportiert wird (Niittylä et al., 2004; Weise et al., 2004) und folglich die PFK5 in der Nacht nicht am Stärkeexport beteiligt zu sein scheint. Die Licht-abhängige Inaktivierung der PFK5 ist jedoch durchaus sinnvoll, da während des Tages die Licht-abhängige Aktivierung der FBPase erfolgt (Baier und Latzko, 1975; Baret und Cadet, 1997). Dieses Protein ist der Konterpart der PFKs und verantwortlich für die Dephosphorylierung von Fru1,6BP. Bei Licht wird demzufolge die Gluconeogenese durch die FBPase bevorzugt und die Glycolyse inhibiert und ein ineffizienter Zyklus vermieden, bei dem ATP verloren ginge.

Die Lipidsynthese findet fast ausschließlich in Chloroplasten statt. So wird bei der Fettsäureherstellung Pyruvat über Acetyl-Coenzym A (CoA) zu Malonyl-CoA umgewandelt. Die Herstellung von Malonyl-CoA ist der erste Schritt der Lipidsynthese und wird durch das Enzym Acetyl-CoA Carboxylase (ACCase) katalysiert (Rawsthorne, 2002). Daneben werden die Ausgangsstoffe für die Produktion von Aminosäuren von den Chloroplasten bereitgestellt. Das 3-Phosphoglycerat ist eine der primären Kohlenstoffverbindungen für die Synthese von Aminosäuren (Heldt und Piechulla, 2015). Aufgrund dieser Synthesewege gibt es in Chloroplasten einen erhöhten Bedarf an C3-Verbindungen, die über die Glycolyse durch die PFK5 gedeckt werden könnten. Gegen diese Theorie spricht jedoch, dass das Schlüsselenzym der Lipidsynthese, die ACCase, sowie die DAHP-Synthase, das Startenzym des Shikimat-Wegs, durch Licht induziert werden (Sasaki et al., 1997; Kozaki und Sasaki, 1999; Entus et al., 2002), während die PFK5 durch Licht inhibiert wird. Diese entgegengesetzte Regulation macht einen potentiellen Einsatz der PFK5 bei der Bereitstellung von C3-Verbindungen für die Lipid- und Aminosäuresynthese abwegig.

Des Weiteren könnte man schlussfolgern, dass die PFK5 aufgrund ihres Regulationsmechanismus in Plastiden heterotropher Gewebe wie der Wurzel wahrscheinlich konstant aktiv ist. Welche physiologische Relevanz die PFK5 in diesen Geweben hat, bleibt zu klären.

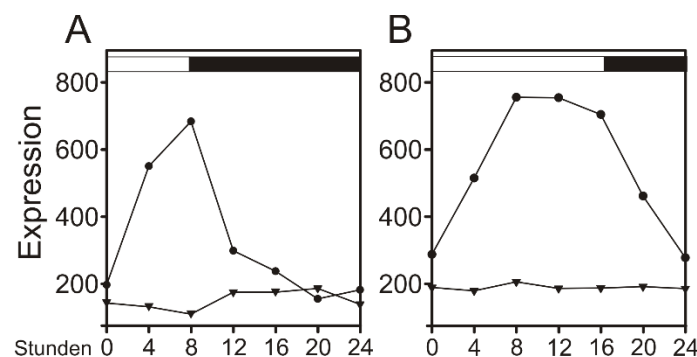


Abbildung 39: Expression der PFK5 und des Maltose Transporters *MEX1* (*At5g17520*) unter (A) Kurztag- und (B) Langtagbedingungen. Kreise stellen die *MEX1*-Expression dar. Dreiecke stehen für die *PFK5*-Expression. Weiße und schwarze Balken über der Grafik symbolisieren die Licht- bzw. Dunkelperiode (Yanovsky und Kay, 2002; Mockler et al., 2007).

Als Helferenzym könnte die PFK5 unter wechselnden Umweltbedingungen die metabolische Flexibilität der Pflanze gewährleisten. Unterstützt wird diese Aussage dadurch, dass die Expression des Maltose Transporters *MEX1*, der vorwiegend bei *Arabidopsis thaliana* für den Stärkeexport in der Nacht verantwortlich ist, circadian reguliert wird. Dabei wird die Expression bei Licht, unabhängig von Kurz- oder Langtag, induziert und nimmt bei Dunkelheit rapide ab

(Abbildung 39). Die PFK5 weist unter Langtagbedingungen ein konstantes Expressionslevel auf, wohingegen die Expression im Kurztag bei Dunkelheit leicht induziert wird (Yanovsky und Kay, 2002; Mockler et al., 2007). Während die Expression, die Translation und die Translokation zur Membran von MEX1 zeitaufwendig ist, erfolgt die Redox-abhängige Regulation deutlich schneller. So wurde für zahlreiche Proteine gezeigt, dass ihre Aktivität innerhalb weniger Minuten beim Wechsel in Dunkelheit modifiziert wurde (Scheibe und Anderson, 1981; Heuer et al., 1982; Scheibe et al., 1989). Unter Bedingungen, bei denen unerwartet zeitweilig Lichtverknappung eintritt und die Photosynthese sowie die CO₂-Assimilation gedrosselt werden, könnten die PFK5 kurzzeitige Energie-Engpässe überbrücken. Die Aktivierung der PFK5 bei Lichtmangel im Tagesverlauf ermöglicht eine schnelle Versorgung der Pflanze mit zusätzlicher Energie. Eine Deletionsmutante würde unter optimalen Standardbedingungen, wie sie in einer Klimakammer vorherrschen, wohl keine phänotypische Veränderung aufweisen. Diese Hypothese würde auch erklären, wieso bei der PFK5-RNAi kein phänotypischer Unterschied zum Wildtyp beobachtet werden konnte. Ein Versuch, bei dem die Pflanzen stark schwankenden Lichtbedingungen ausgesetzt werden, könnte jedoch in phänotypischen Unterschieden resultieren.

Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die β -Untereinheit der PFP eine essentielle Rolle für *Oryza sativa* spielt, da die PFP RNAi-Linien und der T-DNA-Insertionsmutante letal zu sein scheinen. Um die Wichtigkeit der PFP in Reis zu adressieren, ist neben Expression zu dem jeweiligen Zeitpunkt auch die Konzentrationen von Aktivatoren und Inhibitoren von entscheidender Bedeutung. Zudem wird unter Sauerstoffmangel die Expression der PFP α 3-Untereinheit induziert (Mustroph et al., 2013). Dies spricht dafür, dass sich bei Sauerstoffmangel die Untereinheitenkomposition der PFP in Reis verändert. Eine biochemische Analyse könnte Aufschluss darüber geben, ob die induzierte Isoform bei Hypoxie eine veränderte Affinität gegenüber den Regulatoren der PFP aufweist. Dagegen konnte anhand von *Arabidopsis thaliana* T-DNA-Insertionslinien gezeigt werden, dass die vier *PFP* Gene von *Arabidopsis thaliana* nicht zum Überleben der Pflanze bei Überflutung beitragen. Die von Lim et al. (2014) analysierten Doppel- und die Quadrupelmутanten zeigten lediglich unter suboptimalen Bedingungen eine Wachstumsverringernung. Die Analyse der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten PFP β - und PFP α -Doppelmutanten könnte somit klarstellen, ob die PFP für die Fitness der Pflanze bei Überflutung notwendig ist.

Obwohl die Expression der *PFK3* und *PFK6* von *Arabidopsis* PFKs bei Hypoxie induziert ist, konnte bei der Analyse der Doppelmutante dieser PFKs bei Überflutung kein phänotypischer Unterschied zum Wildtyp beobachtet werden. So scheint es, dass die nicht deletierten PFKs bei den T-DNA-Insertionslinien die PFK-Aktivität kompensieren können. Eine Mutante, in der alle cytosolischen PFKs deletiert sind, könnte in Zukunft die Bedeutung der PFKs für *Arabidopsis thaliana* aufklären. Von besonderem Interesse ist die *PFK2*. Die Expression dieser PFK ist nur im trockenen Samen stark. Zudem ist es bislang die einzige PFK, die bei transienter Expression in Tabak keine Aktivität aufweist. Welche Rolle diese PFK im Samen spielt, ist bislang gänzlich unklar.

Die Chloroplasten besitzen ein komplexes Ferredoxin/Thioredoxin-System, das an der Licht-abhängigen Redox-Regulation vieler Proteine beteiligt ist (Lemaire et al., 2007). Die *PFK5* unterliegt in *Arabidopsis thaliana* jener Regulation. Die Cysteine des CXXXXC-Motivs von *PFK5* werden bei Licht oxidiert, was in einer Inhibition der Aktivität des Proteins resultiert. Die *PFK5* weist in Struktur und Regulationsmechanismus eine starke Analogie zur Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase auf. Dieses Protein wird durch die Thioredoxine f und m reguliert (Née et al., 2009). Eines der primären Ziele wäre die Identifikation der an der Redox-Regulation der *PFK5* beteiligten Thioredoxine. Die zusätzliche Aufreinigung und Kristallisation der *PFK5* könnte eine genaue Strukturvorhersage für den Bereich des plastidischen Motivs ermöglichen. Obwohl in dieser Arbeit für die *PFK5* RNAi keine vollständige Reprimierung der

Expression erreicht werden konnte, war die PFK-Aktivität in ausgewählten RNAi-Linien signifikant reduziert. Unter Standardbedingungen unterschieden sich diese RNAi-Linien jedoch nicht vom Wildtyp. So kann die Identifizierung und Analyse von *knock-out* Mutanten zusätzlich Aufschluss über die physiologische Relevanz des Proteins geben.

5 Literaturverzeichnis

- Akman, M., Bhikharie, A.V., McLean, E.H., Boonman, A., Visser, E.J.W., Schranz, M.E., and van Tienderen, P.H.** (2012). Wait or escape? Contrasting submergence tolerance strategies of *Rorippa amphibia*, *Rorippa sylvestris* and their hybrid. *Ann. Bot.* **109**: 1263–1276.
- Alonso, J.M. et al.** (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653–657.
- Alpi, A. and Beevers, H.** (1983). Effects of O₂ Concentration on Rice Seedlings. *Plant Physiol.* **71**: 30–34.
- Alves, A.M., Meijer, W.G., Vrijbloed, J.W., and Dijkhuizen, L.** (1996). Characterization and phylogeny of the pfp gene of *Amycolatopsis methanolica* encoding PPI-dependent phosphofructokinase. *J. Bacteriol.* **178**: 149–155.
- Anderson, L.E. and Duggan, J.X.** (1976). Light Modulation of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. *Plant Physiol.* **58**: 135–139.
- Armstrong, W.** (1979). *Aeration in Higher Plants* (Academic Press).
- Armstrong, W. and Beckett, P.M.** (1985). Root Aeration in Unsaturated Soil: A Multi-Shelled Mathematical Model of Oxygen Diffusion and Distribution with and Without Sectoral Wet-Soil Blocking of the Diffusion Path. *New Phytol.* **100**: 293–311.
- Armstrong, W., Strange, M.E., Cringle, S., and Beckett, P.M.** (1994). Microelectrode and Modelling Study of Oxygen Distribution in Roots. *Ann. Bot.* **74**: 287–299.
- Ashihara, H. and Sato, F.** (1993). Pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and biosynthetic capacity during differentiation of hypocotyls of *Vigna* seedlings. *Biochim. Biophys. Acta* **1156**: 123–127.
- Atwell, B.J., Greenway, H., and Colmer, T.D.** (2015). Efficient use of energy in anoxia-tolerant plants with focus on germinating rice seedlings. *New Phytol.* **206**: 36–56.
- Baier, D. and Latzko, E.** (1975). Properties and regulation of C-1-fructose-1,6-diphosphatase from spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **396**: 141–147.
- Bailey-Serres, J., Kloeckener-Gruissem, B., and Freeling, M.** (1988). Genetic and molecular approaches to the study of the anaerobic response and tissue specific gene expression in maize. *Plant Cell Environ.* **11**: 351–357.
- Bailey-Serres, J. and Voesenek, L.A.C.J.** (2008). Flooding Stress: Acclimations and Genetic Diversity. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 313–339.
- Ball, K.L., Green, J.H., and Rees, T. ap** (1991). Glycolysis at the climacteric of bananas. *Eur. J. Biochem.* **197**: 265–269.
- Balsera, M., Uberegui, E., Susanti, D., Schmitz, R.A., Mukhopadhyay, B., Schürmann, P., and Buchanan, B.B.** (2012). Ferredoxin:thioredoxin reductase (FTR) links the regulation of oxygenic photosynthesis to deeply rooted bacteria. *Planta* **237**: 619–635.
- Banaszak, K., Mechin, I., Obmolova, G., Oldham, M., Chang, S.H., Ruiz, T., Radermacher, M., Kopperschlager, G., and Rypniewski, W.** (2011). The crystal structures of

- eukaryotic phosphofructokinases from baker's yeast and rabbit skeletal muscle. *J. Mol. Biol.* **407**: 284–297.
- Bandyopadhyay, S., Gama, F., Molina-Navarro, M.M., Gualberto, J.M., Claxton, R., Naik, S.G., Huynh, B.H., Herrero, E., Jacquot, J.P., Johnson, M.K., and Rouhier, N.** (2008). Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe–2S] clusters. *EMBO J.* **27**: 1122–1133.
- Banga, M., Slaa, E.J., Blom, C., and Voesenek, L.** (1996). Ethylene Biosynthesis and Accumulation under Drained and Submerged Conditions (A Comparative Study of Two *Rumex* Species). *Plant Physiol.* **112**: 229–237.
- Banzai, T., Hanagata, N., Dubinsky, Z., and Karube, I.** (2003). Fructose-2,6-bisphosphate contents were increased in response to salt, water and osmotic stress in leaves of *Bruguiera gymnorrhiza* by differential changes in the activity of the bifunctional enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphate 2-phosphatase. *Plant Mol. Biol.* **53**: 51–59.
- Baret, P. and Cadet, F.** (1997). Regulation of photosynthetic enzymes via redox systems. *Biochem. Educ.* **25**: 24–26.
- Baud, S., Vaultier, M.-N., and Rochat, C.** (2004). Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **55**: 397–409.
- Bieniawska, Z., Paul Barratt, D.H., Garlick, A.P., Thole, V., Kruger, N.J., Martin, C., Zrenner, R., and Smith, A.M.** (2007). Analysis of the sucrose synthase gene family in *Arabidopsis*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **49**: 810–828.
- Blakeley, S.D., Crews, L., Todd, J.F., and Dennis, D.T.** (1992). Expression of the Genes for the α - and β -Subunits of Pyrophosphate-Dependent Phosphofructokinase in Germinating and Developing Seeds from *Ricinus communis*. *Plant Physiol.* **99**: 1245–1250.
- Borisjuk, L., Rolletschek, H., Radchuk, R., Weschke, W., Wobus, U., and Weber, H.** (2004). Seed development and differentiation: a role for metabolic regulation. *Plant Biol. Stuttg. Ger.* **6**: 375–386.
- Botha, F.C.B.** (1991). Pyrophosphate Dependent Phosphofructokinase of *Citrullus lanatus*: Molecular Forms and Expression of Subunits. *Plant Physiol.* **96**: 1185–92.
- Botha, A.M. and Botha, F.C.** (1993). Induction of Pyrophosphate-Dependent Phosphofructokinase in Watermelon (*Citrullus lanatus*) Cotyledons Coincides with Insufficient Cytosolic D-Fructose-1,6-Bisphosphate 1-Phosphohydrolase to Sustain Gluconeogenesis. *Plant Physiol.* **101**: 1385–1390.
- Bouman, B.A.M., Peng, S., Castañeda, A.R., and Visperas, R.M.** (2005). Yield and water use of irrigated tropical aerobic rice systems. *Agric. Water Manag.* **74**: 87–105.
- Bowsher, C., Steer, M., and Tobin, A.** (2008). *Plant Biochemistry* (Garland Science).
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–254.

- Brun, R. and Schönenberger, null** (1979). Cultivation and in vitro cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. Short communication. *Acta Trop.* **36**: 289–292.
- Carnal, N.W. and Black, C.C.** (1979). Pyrophosphate-dependent 6-phosphofructokinase, a new glycolytic enzyme in pineapple leaves. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **86**: 20–26.
- Carystinos, G.D., MacDonald, H.R., Monroy, A.F., Dhindsa, R.S., and Poole, R.J.** (1995). Vacuolar H⁺-Translocating Pyrophosphatase Is Induced by Anoxia or Chilling in Seedlings of Rice. *Plant Physiol.* **108**: 641–649.
- Catling, H.D.** (1992). *Rice in Deep Water* (Palgrave Macmillan).
- Chen, C.-C., McCarl, B., and Chang, C.-C.** (2011). Climate change, sea level rise and rice: global market implications. *Clim. Change* **110**: 543–560.
- Cheng, W.-H., Endo, A., Zhou, L., Penney, J., Chen, H.-C., Arroyo, A., Leon, P., Nambara, E., Asami, T., Seo, M., Koshiba, T., and Sheen, J.** (2002). A Unique Short-Chain Dehydrogenase/Reductase in *Arabidopsis* Glucose Signaling and Absciscic Acid Biosynthesis and Functions. *Plant Cell* **14**: 2723–2743.
- Chen, W. and Chen, S.** (2014). *Functional Nanometer-Sized Clusters of Transition Metals: Synthesis, Properties and Applications* (Royal Society of Chemistry).
- Chen, Y., Ji, F., Xie, H., Liang, J., and Zhang, J.** (2006). The Regulator of G-Protein Signaling Proteins Involved in Sugar and Absciscic Acid Signaling in *Arabidopsis* Seed Germination. *Plant Physiol.* **140**: 302–310.
- Chibani, K., Couturier, J., Selles, B., Jacquot, J.-P., and Rouhier, N.** (2009). The chloroplastic thiol reducing systems: dual functions in the regulation of carbohydrate metabolism and regeneration of antioxidant enzymes, emphasis on the poplar redoxin equipment. *Photosynth. Res.* **104**: 75–99.
- Christianson, J.A., Llewellyn, D.J., Dennis, E.S., and Wilson, I.W.** (2010). Comparisons of early transcriptome responses to low-oxygen environments in three dicotyledonous plant species. *Plant Signal. Behav.* **5**: 1006–1009.
- Colmer, T.D., Huang, S., and Greenway, H.** (2001). Evidence for down-regulation of ethanolic fermentation and K⁺ effluxes in the coleoptile of rice seedlings during prolonged anoxia. *J. Exp. Bot.* **52**: 1507–1517.
- Colmer, T.D. and Voesenek, L.A.C.J.** (2009). Flooding tolerance: suites of plant traits in variable environments. *Funct. Plant Biol.* **36**: 665–681.
- Commichau, F.M., Rothe, F.M., Herzberg, C., Wagner, E., Hellwig, D., Lehnik-Habrink, M., Hammer, E., Völker, U., and Stülke, J.** (2009). Novel Activities of Glycolytic Enzymes in *Bacillus subtilis*. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **8**: 1350–1360.
- Costa dos Santos, A., Seixas da-Silva, W., de Meis, L., and Galina, A.** (2003). Proton Transport in Maize Tonoplasts Supported by Fructose-1,6-Bisphosphate Cleavage. Pyrophosphate-Dependent Phosphofructokinase as a Pyrophosphate-Regenerating System. *Plant Physiol.* **133**: 885–892.
- Couturier, J., Chibani, K., Jacquot, J.-P., and Rouhier, N.** (2013). Cysteine-based redox regulation and signaling in plants. *Front. Plant Sci.* **4**: 105.

- Couturier, J., Jacquot, J.-P., and Rouhier, N.** (2009). Evolution and diversity of glutaredoxins in photosynthetic organisms. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**: 2539–2557.
- Crack, J., Green, J., and Thomson, A.J.** (2004). Mechanism of oxygen sensing by the bacterial transcription factor fumarate-nitrate reduction (FNR). *J. Biol. Chem.* **279**: 9278–9286.
- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.-M., and Brenner, S.E.** (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* **14**: 1188–1190.
- Cséke, C. and Buchanan, B.B.** (1983). An enzyme synthesizing fructose 2,6-bisphosphate occurs in leaves and is regulated by metabolite effectors. *FEBS Lett.* **155**: 139–142.
- Cséke, C., Nishizawa, A.N., and Buchanan, B.B.** (1982a). Modulation of Chloroplast Phosphofructokinase by NADPH. *Plant Physiol.* **70**: 658–661.
- Cséke, C., Weeden, N.F., Buchanan, B.B., and Uyeda, K.** (1982b). A special fructose bisphosphate functions as a cytoplasmic regulatory metabolite in green leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**: 4322–4326.
- Curtis, M.D. and Grossniklaus, U.** (2003). A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Planta. *Plant Physiol.* **133**: 462–469.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, G., Giustarini, D., and Milzani, A.** (2009). Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. *Trends Biochem. Sci.* **34**: 85–96.
- Dancer, J.E. and Rees, T.A.** (1989). Effects of 2,4-dinitrophenol and anoxia on the inorganic-pyrophosphate content of the spadix of *Arum maculatum* and the root apices of *Pisum sativum*. *Planta* **178**: 421–424.
- David W. McKinney, B.B.B.** (1978). Activation of chloroplast ATPase by reduced thioredoxin. *Phytochemistry* **17**: 794–795.
- David W. McKinney, B.B.B.** (1979). Association of a thioredoxin-like protein with chloroplast coupling factor (CF1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **86**: 1178–84.
- Davies, D.D., Grego, S., and Kenworthy, P.** (1974). The control of the production of lactate and ethanol by higher plants. *Planta* **118**: 297–310.
- Dekkers, B.J.W., Schuurmans, J.A.M.J., and Smeekens, S.C.M.** (2004). Glucose delays seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **218**: 579–588.
- Deng, Z., Huang, M., Singh, K., Albach, R.A., Latshaw, S.P., Chang, K.P., and Kemp, R.G.** (1998). Cloning and expression of the gene for the active PPI-dependent phosphofructokinase of *Entamoeba histolytica*. *Biochem. J.* **329**: 659–664.
- Dennis, E.S., Dolferus, R., Ellis, M., Rahman, M., Wu, Y., Hoeren, F.U., Grover, A., Ismond, K.P., Good, A.G., and Peacock, W.J.** (2000). Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. *J. Exp. Bot.* **51**: 89–97.
- Dolferus, R., Ellis, M., Bruxelles, G.D., Trevaskis, B., Hoeren, F., Dennis, E.S., and Peacock, W.J.** (1997). Strategies of Gene Action in *Arabidopsis* during Hypoxia. *Ann. Bot.* **79**: 21–31.

- van Dongen, J.T., Fröhlich, A., Ramírez-Aguilar, S.J., Schauer, N., Fernie, A.R., Erban, A., Kopka, J., Clark, J., Langer, A., and Geigenberger, P.** (2009). Transcript and metabolite profiling of the adaptive response to mild decreases in oxygen concentration in the roots of arabidopsis plants. *Ann. Bot.* **103**: 269–280.
- van Dongen, J.T., Schurr, U., Pfister, M., and Geigenberger, P.** (2003). Phloem metabolism and function have to cope with low internal oxygen. *Plant Physiol.* **131**: 1529–1543.
- Draborg, H., Villadsen, D., and Nielsen, T.H.** (2001). Transgenic Arabidopsis plants with decreased activity of fructose-6-phosphate,2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase have altered carbon partitioning. *Plant Physiol.* **126**: 750–758.
- Drew, M.C.** (1997). OXYGEN DEFICIENCY AND ROOT METABOLISM: Injury and Acclimation Under Hypoxia and Anoxia. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 223–250.
- Drew, M.C., He, C.-J., and Morgan, P.W.** (2000). Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends Plant Sci.* **5**: 123–127.
- Eastmond, P.J., Astley, H.M., Parsley, K., Aubry, S., Williams, B.P., Menard, G.N., Craddock, C.P., Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R., and Hibberd, J.M.** (2015). Arabidopsis uses two gluconeogenic gateways for organic acids to fuel seedling establishment. *Nat. Commun.* **6**: 6659.
- El-Mansi, E.M.T., Bryce, C.F.A., Demain, A.L., and Allman, A.R.** (2011). *Fermentation Microbiology and Biotechnology*, Third Edition (CRC Press).
- Enomoto, T., Ohyama, H., Inui, H., Miyatake, K., Nakano, Y., and Kitaoka, S.** (1990). Roles of pyrophosphate: d-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and fructose-2,6-bisphosphate in the regulation of glycolysis during acclimation of aerobic *Euglena gracilis* to anaerobiosis. *Plant Sci.* **67**: 161–167.
- Entus, R., Poling, M., and Herrmann, K.M.** (2002). Redox Regulation of Arabidopsis 3-Deoxy-d-arabino-Heptulosonate 7-Phosphate Synthase. *Plant Physiol.* **129**: 1866–1871.
- Evans, D.E.** (2004). Aerenchyma formation. *New Phytol.* **161**: 35–49.
- FAO Statistical Yearbook 2012**
- Felle, H.H.** (2005). pH Regulation in Anoxic Plants. *Ann. Bot.* **96**: 519–532.
- Ferjani, A., Segami, S., Horiguchi, G., Muto, Y., Maeshima, M., and Tsukaya, H.** (2011). Keep an Eye on PPI: The Vacuolar-Type H⁺-Pyrophosphatase Regulates Postgerminative Development in Arabidopsis. *Plant Cell* **23**: 2895–2908.
- Ferjani, A., Segami, S., Horiguchi, G., Sakata, A., Maeshima, M., and Tsukaya, H.** (2012). Regulation of pyrophosphate levels by H⁺-PPase is central for proper resumption of early plant development. *Plant Signal. Behav.* **7**: 38–42.
- Fukao, T. and Bailey-Serres, J.** (2004). Plant responses to hypoxia – is survival a balancing act? *Trends Plant Sci.* **9**: 449–456.
- Fukao, T. and Bailey-Serres, J.** (2008). Submergence tolerance conferred by Sub1A is mediated by SLR1 and SLRL1 restriction of gibberellin responses in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**: 16814–16819.

- Fukao, T., Xu, A.K., Ronald, B.P.C., and A, J.B.** (2006). A variable cluster of ethylene response factor-like genes regulates metabolic and developmental acclimation responses to submergence in rice. *Plant Cell* **18**.
- Gazzarrini, S. and McCourt, P.** (2001). Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 387–391.
- Geigenberger, P., Fernie, A.R., Gibon, Y., Christ, M., and Stitt, M.** (2000). Metabolic activity decreases as an adaptive response to low internal oxygen in growing potato tubers. *Biol. Chem.* **381**: 723–740.
- Gibbs, D.J., Lee, S.C., Md Isa, N., Gramuglia, S., Fukao, T., Bassel, G.W., Correia, C.S., Corbineau, F., Theodoulou, F.L., Bailey-Serres, J., and Holdsworth, M.J.** (2011). Homeostatic response to hypoxia is regulated by the N-end rule pathway in plants. *Nature* **479**: 415–418.
- Gibbs, J., Morrell, S., Valdez, A., Setter, T.L., and Greenway, H.** (2000). Regulation of alcoholic fermentation in coleoptiles of two rice cultivars differing in tolerance to anoxia. *J. Exp. Bot.* **51**: 785–796.
- Gibbs, M. and Latzko, E.** (2012). *Photosynthesis II: Photosynthetic Carbon Metabolism and Related Processes* (Springer Science & Business Media).
- Gibson, S.I.** (2005). Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 93–102.
- Gibson, S.I.** (2000). Plant Sugar-Response Pathways. Part of a Complex Regulatory Web. *Plant Physiol.* **124**: 1532–1539.
- Gonzali, S., Loreti, E., Novi, G., Poggi, A., Alpi, A., and Perata, P.** (2005). The use of microarrays to study the anaerobic response in Arabidopsis. *Ann. Bot.* **96**: 661–668.
- Goodstein, D.M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R.D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., and Rokhsar, D.S.** (2012). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res.* **40**: D1178–1186.
- Gottwald, J.R., Krysan, P.J., Young, J.C., Evert, R.F., and Sussman, M.R.** (2000). Genetic evidence for the in planta role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 13979–13984.
- Greenway, H. and Gibbs, J.** (2003). Review: Mechanisms of anoxia tolerance in plants. II. Energy requirements for maintenance and energy distribution to essential processes. *Funct. Plant Biol.* **30**: 999–1036.
- Groenewald, J.-H. and Botha, F.C.** (2008). Down-regulation of pyrophosphate: fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase (PFP) activity in sugarcane enhances sucrose accumulation in immature internodes. *Transgenic Res.* **17**: 85–92.
- Guglielminetti, L., Perata, P., and Alpi, A.** (1995). Effect of Anoxia on Carbohydrate Metabolism in Rice Seedlings. *Plant Physiol.* **108**: 735–741.
- Gupta, A.K. and Kaur, N.** (2005). Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *J. Biosci.* **30**: 761–776.
- Hajirezaei, M., Sonnewald, U., Viola, R., Carlisle, S., Dennis, D., and Stitt, M.** (1993). Transgenic potato plants with strongly decreased expression of

- pyrophosphate:fructose-6-phosphate phosphotransferase show no visible phenotype and only minor changes in metabolic fluxes in their tubers. *Planta* **192**: 16–30.
- Hajirezaei, M., Sonnewald, U., Viola, R., Carlisle, S., Dennis, D., and Stitt, M.** (1994). Transgenic potato plants with strongly decreased expression of pyrophosphate:fructose-6-phosphate phosphotransferase show no visible phenotype and only minor changes in metabolic fluxes in their tubers. *Planta* **192**: 16–30.
- Hajirezaei, M. and Stitt, M.** (1991). Contrasting roles for pyrophosphate:fructose-6-phosphate phosphotransferase during aging of tissue slices from potato tubers and carrot storage tissues. *Plant Sci.* **77**: 177–183.
- Harthill, J.E., Meek, S.E.M., Morrice, N., Pegg, M.W., Borch, J., Wong, B.H.C., and MacKintosh, C.** (2006). Phosphorylation and 14-3-3 binding of Arabidopsis trehalose-phosphate synthase 5 in response to 2-deoxyglucose. *Plant J.* **47**: 211–223.
- Hatch, M.D. and Boardman, N.K.** (2014). *Photosynthesis: The Biochemistry of Plants* (Elsevier).
- Hattori, Y. et al.** (2009). The ethylene response factors SNORKEL1 and SNORKEL2 allow rice to adapt to deep water. *Nature* **460**: 1026–1030.
- Häusler, R.E., Holtum, J.A.M., and Latzko, E.** (1989). Cytosolic Phosphofructokinase from Spinach Leaves 1. *Plant Physiol.* **90**: 1498–1505.
- Heldt, H.W. and Piechulla, B.** (2015). *Pflanzenbiochemie* (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg).
- Heuer, B., Hansen, M.J., and Anderson, L.E.** (1982). Light Modulation of Phosphofructokinase in Pea Leaf Chloroplasts. *Plant Physiol.* **69**: 1404–1406.
- Hill, S.A. and Rees, T. ap** (1995). The effect of hypoxia on the control of carbohydrate metabolism in ripening bananas. *Planta* **197**: 313–323.
- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J., and Schilperoort, R.A.** (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* **303**: 179–180.
- Höfgen, R. and Willmitzer, L.** (1990). Biochemical and genetic analysis of different patatin isoforms expressed in various organs of potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Sci.* **66**: 221–230.
- Höfgen, R. and Willmitzer, L.** (1988). Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res.* **16**: 9877.
- Hole, D.J., Cobb, B.G., Hole, P.S., and Drew, M.C.** (1992). Enhancement of Anaerobic Respiration in Root Tips of Zea mays following Low-Oxygen (Hypoxic) Acclimation. *Plant Physiol.* **99**: 213–218.
- Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S., and Hoekema, A.** (1993). New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res.* **2**: 208–218.
- Huang, S., Colmer, T.D., and Millar, A.H.** (2008). Does anoxia tolerance involve altering the energy currency towards PPi? *Trends Plant Sci.* **13**: 221–227.

- Huang, S., Greenway, H., Colmer, T.D., and Millar, A.H.** (2005). Protein synthesis by rice coleoptiles during prolonged anoxia: implications for glycolysis, growth and energy utilization. *Ann. Bot.* **96**: 703–715.
- Igamberdiev, A.U. and Kleczkowski, L.A.** (2001). Implications of adenylate kinase-governed equilibrium of adenylates on contents of free magnesium in plant cells and compartments. *Biochem. J.* **360**: 225–231.
- Igamberdiev, A.U. and Kleczkowski, L.A.** (2011). Magnesium and cell energetics in plants under anoxia. *Biochem. J.* **437**: 373–379.
- Isaac, J.E. and Rhodes, M.J.C.** (1982). Purification and properties of phosphofructokinase from fruits of *Lycopersicon esculentum*. *Phytochemistry* **21**: 1553–1556.
- Ismond, K.P., Dolferus, R., De Pauw, M., Dennis, E.S., and Good, A.G.** (2003). Enhanced Low Oxygen Survival in *Arabidopsis* through Increased Metabolic Flux in the Fermentative Pathway. *Plant Physiol.* **132**: 1292–1302.
- Issakidis, E., Miginiac-Maslow, M., Decottignies, P., Jacquot, J.P., Crétin, C., and Gadal, P.** (1992). Site-directed mutagenesis reveals the involvement of an additional thioredoxin-dependent regulatory site in the activation of recombinant sorghum leaf NADP-malate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **267**: 21577–21583.
- Ito, H., Iwabuchi, M., and Ogawa, K. 'ichi** (2003). The sugar-metabolic enzymes aldolase and triose-phosphate isomerase are targets of glutathionylation in *Arabidopsis thaliana*: detection using biotinylated glutathione. *Plant Cell Physiol.* **44**: 655–660.
- Jackson, M.B.** (1985). Ethylene and Responses of Plants to Soil Waterlogging and Submergence. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **36**: 145–174.
- Jackson, M.B. and Colmer, T.D.** (2005). Response and Adaptation by Plants to Flooding Stress. *Ann. Bot.* **96**: 501–505.
- Jacquot, J.-P., Lopez-Jaramillo, J., Miginiac-Maslow, M., Lemaire, S., Cherfils, J., Chueca, A., and Lopez-Gorge, J.** (1997). Cysteine-153 is required for redox regulation of pea chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *FEBS Lett.* **401**: 143–147.
- Jeong, D.-H. et al.** (2006). Generation of a flanking sequence-tag database for activation-tagging lines in japonica rice. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **45**: 123–132.
- Johnson, H.S. and Hatch, M.D.** (1970). Properties and regulation of leaf nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-malate dehydrogenase and “malic” enzyme in plants with the C4-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. *Biochem. J.* **119**: 273–280.
- Johnson, J., Cobb, B.G., and Drew, M.C.** (1989). Hypoxic Induction of Anoxia Tolerance in Root Tips of *Zea mays*. *Plant Physiol.* **91**: 837–841.
- Kachru, R.B. and Anderson, L.E.** (1975). Inactivation of pea leaf phosphofructokinase by light and dithiothreitol. *Plant Physiol.* **55**: 199–202.
- Karimi, M., Inzé, D., and Depicker, A.** (2002). GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* **7**: 193–195.
- Kato-Noguchi, H.** (2002). The catalytic direction of pyrophosphate:fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase in rice coleoptiles in anoxia. *Physiol. Plant.* **116**: 345–350.

- Kato-Noguchi, H. and Watada, A.E.** (1996). Low-oxygen Atmosphere Increases Fructose 2,6-bisphosphate in Fresh-cut Carrots. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **121**: 307–309.
- Kawahara, Y. et al.** (2013). Improvement of the *Oryza sativa* Nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data. *Rice* **6**: 1–10.
- Kearse, M. et al.** (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **28**: 1647–1649.
- Kelley, L.A. and Sternberg, M.J.E.** (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protoc.* **4**: 363–371.
- Kelly, G.J. and Latzko, E.** (1977a). Chloroplast Phosphofructokinase. *Plant Physiol.* **60**: 290–294.
- Kelly, G.J. and Latzko, E.** (1977b). Chloroplast Phosphofructokinase: II. Partial Purification, Kinetic and Regulatory Properties. *Plant Physiol.* **60**: 295–299.
- Kende, H., Knaap, E. van der, and Cho, H.-T.** (1998). Deepwater Rice: A Model Plant to Study Stem Elongation. *Plant Physiol.* **118**: 1105–1110.
- K. K.Surendranathan, M.G.I.** (1992). Mechanism of action of a dimeric phosphofructokinase from banana: role of magnesium on its kinetics and regulation. *Plant Sci.* **81**: 29–36.
- Klok, E.J., Wilson, I.W., Wilson, D., Chapman, S.C., Ewing, R.M., Somerville, S.C., Peacock, W.J., Dolferus, R., and Dennis, E.S.** (2002). Expression profile analysis of the low-oxygen response in *Arabidopsis* root cultures. *Plant Cell* **14**: 2481–2494.
- Klomsiri, C., Karplus, P.A., and Poole, L.B.** (2011). Cysteine-Based Redox Switches in Enzymes. *Antioxid. Redox Signal.* **14**: 1065–1077.
- Kloos, M., Brüser, A., Kirchberger, J., Schöneberg, T., and Sträter, N.** (2014). Crystallization and preliminary crystallographic analysis of human muscle phosphofructokinase, the main regulator of glycolysis. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* **70**: 578–582.
- Knowles, V.L., Greyson, M.F., and Dennis, D.T.** (1990). Characterization of ATP-Dependent Fructose 6-Phosphate 1-Phosphotransferase Isozymes from Leaf and Endosperm Tissues of *Ricinus communis*. *Plant Physiol.* **92**: 155–159.
- Koch, K.E.** (1996). Carbohydrate-Modulated Gene Expression in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 509–540.
- Kombrink, E. and Kruger, N.J.** (1984). Inhibition by Metabolic Intermediates of Pyrophosphate : Fructose 6-Phosphate Phosphotransferase from Germinating Castor Bean Endosperm. *Z. Für Pflanzenphysiol.* **114**: 443–453.
- Kozaki, A. and Sasaki, Y.** (1999). Light-dependent changes in redox status of the plastidic acetyl-CoA carboxylase and its regulatory component. *Biochem. J.* **339**: 541–546.
- Kroemer, G., Dallaporta, B., and Resche-Rigon, M.** (1998). The Mitochondrial Death/Life Regulator in Apoptosis and Necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* **60**: 619–642.
- Kruger, N.J. and Beevers, H.** (1985). Synthesis and Degradation of Fructose 2,6-Bisphosphate in Endosperm of Castor Bean Seedlings. *Plant Physiol.* **77**: 358–364.

- Kruger, N.J. and Dennis, D.T.** (1987). Molecular properties of pyrophosphate:fructose-6-phosphate phosphotransferase from potato tuber. *Arch. Biochem. Biophys.* **256**: 273–279.
- Kruger, N.J., Hammond, J.B., and Burrell, M.M.** (1988). Molecular characterization of four forms of phosphofructokinase purified from potato tuber. *Arch. Biochem. Biophys.* **267**: 690–700.
- Kruger, N.J. and Scott, P.** (1995). Integration of cytosolic and plastidic carbon metabolism by fructose 2,6-bisphosphate. *J. Exp. Bot.* **46**: 1325–1333.
- Kulichikhin, K.Y., Aitio, O., Chirkova, T.V., and Fagerstedt, K.V.** (2007). Effect of oxygen concentration on intracellular pH, glucose-6-phosphate and NTP content in rice (*Oryza sativa*) and wheat (*Triticum aestivum*) root tips: in vivo ³¹P-NMR study. *Physiol. Plant.* **129**: 507–518.
- Kulma, A., Villadsen, D., Campbell, D.G., Meek, S.E.M., Harthill, J.E., Nielsen, T.H., and MacKintosh, C.** (2004). Phosphorylation and 14-3-3 binding of Arabidopsis 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **37**: 654–667.
- Laanbroek, H.J.** (1990). Bacterial cycling of minerals that affect plant growth in waterlogged soils: a review. *Aquat. Bot.* **38**: 109–125.
- Lahiri, S., Roy, A., Baby, S.M., Hoshi, T., Semenza, G.L., and Prabhakar, N.R.** (2006). Oxygen sensing in the body. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **91**: 249–286.
- Lambden, P.R. and Guest, J.R.** (1976). Mutants of *Escherichia coli* K12 unable to use fumarate as an anaerobic electron acceptor. *J. Gen. Microbiol.* **97**: 145–160.
- Larkin, M.A. et al.** (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **23**: 2947–2948.
- Larondelle, Y., Mertens, E., Van Schaftingen, E., and Hers, H.G.** (1986). Purification and properties of spinach leaf phosphofructokinase 2/fructose 2,6-bisphosphatase. *Eur. J. Biochem. FEBS* **161**: 351–357.
- Lasanthi-Kudahettige, R., Magneschi, L., Loreti, E., Gonzali, S., Licausi, F., Novi, G., Beretta, O., Vitulli, F., Alpi, A., and Perata, P.** (2007). Transcript Profiling of the Anoxic Rice Coleoptile. *Plant Physiol.* **144**: 218–231.
- Lee, T.C. and Langston-Unkefer, P.J.** (1985). Pyruvate Decarboxylase from *Zea Mays* L. *Plant Physiol U. S.* **79**:1.
- Leigh, A.J.P.** (1993). Kinetics of the Vacuolar H-Pyrophosphatase : The Roles of Magnesium, Pyrophosphate, and their Complexes as Substrates, Activators, and Inhibitors. *Plant Physiol.* **100**: 1698–705.
- Lemaire, M., Issakidis, E., Ruelland, E., Decottignies, P., and Miginiac-Maslow, M.** (1996). An active-site cysteine of sorghum leaf NADP-malate dehydrogenase studied by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett.* **382**: 137–140.
- Lemaire, S.D., Michelet, L., Zaffagnini, M., Massot, V., and Issakidis-Bourguet, E.** (2007). Thioredoxins in chloroplasts. *Curr. Genet.* **51**: 343–365.

- Lendzian, K.J.** (1980). Modulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase by NADPH, NADP and dithiothreitol at variable NADPH/NADP ratios in an illuminated reconstituted Spinach (*Spinacia oleracea* L.) chloroplast system. *Planta* **148**: 1–6.
- Licausi, F., Kosmacz, M., Weits, D.A., Giuntoli, B., Giorgi, F.M., Voesenek, L.A.C.J., Perata, P., and van Dongen, J.T.** (2011). Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization. *Nature* **479**: 419–422.
- Liesack, W., Schnell, S., and Revsbech, N.P.** (2000). Microbiology of flooded rice paddies. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 625–645.
- Li, H., Shen, J.-J., Zheng, Z.-L., Lin, Y., and Yang, Z.** (2001). The Rop GTPase Switch Controls Multiple Developmental Processes in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **126**: 670–684.
- Lim, H., Cho, M.-H., Bhoo, S.H., and Hahn, T.-R.** (2013). Pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase is involved in the tolerance of Arabidopsis seedlings to salt and osmotic stresses. *Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* **50**: 84–91.
- Lim, H., Cho, M.-H., Jeon, J.-S., Bhoo, S.H., Kwon, Y.-K., and Hahn, T.-R.** (2009). Altered expression of pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase affects the growth of transgenic Arabidopsis plants. *Mol. Cells* **27**: 641–649.
- Lim, H.-M., Cho, J.-I., Lee, S., Cho, M.-H., Bhoo, S.H., An, G., Hahn, T.-R., and Jeon, J.-S.** (2007). Identification of a 20-bp regulatory element of the Arabidopsis pyrophosphate:fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase $\alpha 2$ gene that is essential for expression. *Plant Cell Rep.* **26**: 683–692.
- Liu, M., Huang, Y., Wu, J., Wang, E., and Wang, Y.** (1999). Effect of cysteine residues on the activity of arginyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*. *Biochemistry (Mosc.)* **38**: 11006–11011.
- Lloyd, J.C. and Zakhleniuk, O.V.** (2004). Responses of primary and secondary metabolism to sugar accumulation revealed by microarray expression analysis of the Arabidopsis mutant, *pho3*. *J. Exp. Bot.* **55**: 1221–1230.
- Lorbiecke, R. and Sauter, M.** (1999). Adventitious Root Growth and Cell-Cycle Induction in Deepwater Rice. *Plant Physiol.* **119**: 21–30.
- Loreti, E., Yamaguchi, J., Alpi, A., and Pereta, P.** (2003). Sugar Modulation of α -Amylase Genes under Anoxia. *Ann. Bot.* **91**: 143–148.
- Lundblad, R.L. and Macdonald, F.** (2010). *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, Fourth Edition (CRC Press).
- Maeshima, M.** (2000). Vacuolar H⁺-pyrophosphatase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1465**: 37–51.
- Mahajan, R. and Singh, R.** (1989). Properties of Pyrophosphate:Fructose-6-Phosphate Phosphotransferase from Endosperm of Developing Wheat (*Triticum aestivum* L.) Grains. *Plant Physiol.* **91**: 421–426.
- Mahajan, R. and Singh, R.** (1990). Sucrose metabolism in developing endosperm of immature wheat (*Triticum aestivum* L.) grain. *Indian J. Biochem. Biophys.* **27**: 324–328.

- Maraña, C., García-Olmedo, F., and Carbonero, P.** (1990). Differential expression of two types of sucrose synthase-encoding genes in wheat in response to anaerobiosis, cold shock and light. *Gene* **88**: 167–172.
- Martinez-Oyanedel, J., McNae, I.W., Nowicki, M.W., Keillor, J.W., Michels, P.A.M., Fothergill-Gilmore, L.A., and Walkinshaw, M.D.** (2007). The first crystal structure of phosphofructokinase from a eukaryote: *Trypanosoma brucei*. *J. Mol. Biol.* **366**: 1185–1198.
- McCormick, A.J. and Kruger, N.J.** (2015). Lack of fructose 2,6-bisphosphate compromises photosynthesis and growth in *Arabidopsis* in fluctuating environments. *Plant J.* **81**: 670–683.
- McNae, I.W., Martinez-Oyanedel, J., Keillor, J.W., Michels, P.A.M., Fothergill-Gilmore, L.A., and Walkinshaw, M.D.** (2009). The crystal structure of ATP-bound phosphofructokinase from *Trypanosoma brucei* reveals conformational transitions different from those of other phosphofructokinases. *J. Mol. Biol.* **385**: 1519–1533.
- Menegus, F., Cattaruzza, L., Mattana, M., Beffagna, N., and Ragg, E.** (1991). Response to Anoxia in Rice and Wheat Seedlings. *Plant Physiol.* **95**: 760–767.
- Mergemann, H. and Sauter, M.** (2000). Ethylene Induces Epidermal Cell Death at the Site of Adventitious Root Emergence in Rice. *Plant Physiol.* **124**: 609–614.
- Mertens, E.** (1991). Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase, an anaerobic glycolytic enzyme? *FEBS Lett.* **285**: 1–5.
- Mertens, E., Larondelle, Y., and Hers, H.G.** (1990). Induction of pyrophosphate:fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase by anoxia in rice seedlings. *Plant Physiol.* **93**: 584–587.
- Michelet, L., Zaffagnini, M., Marchand, C., Collin, V., Decottignies, P., Tsan, P., Lancelin, J.-M., Trost, P., Miginiac-Maslow, M., Noctor, G., and Lemaire, S.D.** (2005). Glutathionylation of chloroplast thioredoxin f is a redox signaling mechanism in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 16478–16483.
- Michelet, L., Zaffagnini, M., Morisse, S., Sparla, F., Pérez-Pérez, M.E., Francia, F., Danon, A., Marchand, C., Fermani, S., Trost, P., and Lemaire, S.D.** (2013). Redox regulation of the Calvin–Benson cycle: something old, something new. *Plant Physiol.* **4**: 470.
- Michels, P.A.M. and Rigden, D.J.** (2006). Evolutionary analysis of fructose 2,6-bisphosphate metabolism. *IUBMB Life* **58**: 133–141.
- Miro, B. and Ismail, A.M.** (2013). Tolerance of anaerobic conditions caused by flooding during germination and early growth in rice (*Oryza sativa* L.). *Front. Plant Sci.* **4**.
- Mockler, T.C., Michael, T.P., Priest, H.D., Shen, R., Sullivan, C.M., Givan, S.A., McEntee, C., Kay, S.A., and Chory, J.** (2007). The DIURNAL project: DIURNAL and circadian expression profiling, model-based pattern matching, and promoter analysis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **72**: 353–363.
- Mohanty, B., Wilson, P.M., and Rees, T. ap** (1993). Effects of anoxia on growth and carbohydrate metabolism in suspension cultures of soybean and rice. *Phytochemistry* **34**: 75–82.

- Moons, A., Valcke, R., and Van Montagu, M.** (1998). Low-oxygen stress and water deficit induce cytosolic pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK) expression in roots of rice, a C3 plant. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **15**: 89–98.
- Mosser, R., Reddy, M.C.M., Bruning, J.B., Sacchettini, J.C., and Reinhart, G.D.** (2012). Structure of the apo form of *Bacillus stearothermophilus* phosphofructokinase. *Biochemistry (Mosc.)* **51**: 769–775.
- Mugnai, S., Marras, A.M., and Mancuso, S.** (2011). Effect of hypoxic acclimation on anoxia tolerance in *Vitis* roots: response of metabolic activity and K⁺ fluxes. *Plant Cell Physiol.* **52**: 1107–1116.
- Mühlenbock, P., Plaszczyca, M., Plaszczyca, M., Mellerowicz, E., and Karpinski, S.** (2007). Lysigenous Aerenchyma Formation in *Arabidopsis* Is Controlled by LESION SIMULATING DISEASE1. *Plant Cell* **19**: 3819–3830.
- Mustroph, A., Albrecht, G., Hajirezaei, M., Grimm, B., and Biemelt, S.** (2005). Low levels of pyrophosphate in transgenic potato plants expressing *E. coli* pyrophosphatase lead to decreased vitality under oxygen deficiency. *Ann. Bot.* **96**: 717–726.
- Mustroph, A., Boamfa, E.I., Laarhoven, L.J.J., Harren, F.J.M., Albrecht, G., and Grimm, B.** (2006). Organ-specific analysis of the anaerobic primary metabolism in rice and wheat seedlings. I: Dark ethanol production is dominated by the shoots. *Planta* **225**: 103–114.
- Mustroph, A., Hess, N., and Sasidharan, R.** (2014). Hypoxic Energy Metabolism and PPi as an Alternative Energy Currency. In *Low-Oxygen Stress in Plants*, J.T. van Dongen and F. Licausi, eds, *Plant Cell Monographs*. (Springer Vienna), pp. 165–184.
- Mustroph, A., Lee, S.C., Oosumi, T., Zanetti, M.E., Yang, H., Ma, K., Yaghoubi-Masihi, A., Fukao, T., and Bailey-Serres, J.** (2010). Cross-kingdom comparison of transcriptomic adjustments to low-oxygen stress highlights conserved and plant-specific responses. *Plant Physiol.* **152**: 1484–1500.
- Mustroph, A., Sonnewald, U., and Biemelt, S.** (2007). Characterisation of the ATP-dependent phosphofructokinase gene family from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **581**: 2401–2410.
- Mustroph, A., Stock, J., Hess, N., Aldous, S., Dreilich, A., and Grimm, B.** (2013). Characterization of the Phosphofructokinase Gene Family in Rice and Its Expression Under Oxygen Deficiency Stress. *Front. Plant Sci.* **4**.
- Mustroph, A., Zanetti, M.E., Jang, C.J.H., Holtan, H.E., Repetti, P.P., Galbraith, D.W., Girke, T., and Bailey-Serres, J.** (2009). Profiling translatoemes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 18843–18848.
- Nair, B.G.D.** (1981). Identification of multiple forms of phosphofructokinase in ripening dwarf cavendish banana. *Phytochemistry* **20**: 605–609.
- Nakamura, N., Suzuki, Y., and Suzuki, H.** (1992). Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase from pollen: properties and possible roles in sugar metabolism. *Physiol. Plant.* **86**: 616–622.
- Nanos, G.D. and Kader, A.A.** (1993). Low O₂-induced changes in pH and energy charge in pear fruit tissue. *Postharvest Biol. Technol.* **3**: 285–291.

- Narsai, R., Rocha, M., Geigenberger, P., Whelan, J., and van Dongen, J.T.** (2011). Comparative analysis between plant species of transcriptional and metabolic responses to hypoxia. *New Phytol.* **190**: 472–487.
- Neal, M.J. and Girton, R.E.** (1955). The Pasteur Effect in Maize. *Am. J. Bot.* **42**: 733–737.
- Née, G., Aumont-Nicaise, M., Zaffagnini, M., Nessler, S., Valerio-Lepiniec, M., and Issakidis-Bourguet, E.** (2014). Redox regulation of chloroplastic G6PDH activity by thioredoxin occurs through structural changes modifying substrate accessibility and cofactor binding. *Biochem. J.* **457**: 117–125.
- Née, G., Zaffagnini, M., Trost, P., and Issakidis-Bourguet, E.** (2009). Redox regulation of chloroplastic glucose-6-phosphate dehydrogenase: a new role for f-type thioredoxin. *FEBS Lett.* **583**: 2827–2832.
- Newman, J.A., Hewitt, L., Rodrigues, C., Solovyova, A.S., Harwood, C.R., and Lewis, R.J.** (2012). Dissection of the network of interactions that links RNA processing with glycolysis in the *Bacillus subtilis* degradosome. *J. Mol. Biol.* **416**: 121–136.
- Nguyen Thi Minh, H., Kawaguchi, T., and Nguyen Thi Minh, H.** (2002). Overview of rice production system in the Mekong Delta-Vietnam. *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.* **47**: 221–231.
- Nielsen, T.H.** (1994). Pyrophosphate:fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase from barley seedlings. Isolation, subunit composition and kinetic Characterization. *Physiol. Plant.* **92**: 311–321.
- Nielsen, T.H., Rung, J.H., and Villadsen, D.** (2004). Fructose-2,6-bisphosphate: a traffic signal in plant metabolism. *Trends Plant Sci.* **9**: 556–563.
- Nielsen, T.H. and Stitt, M.** (2001a). Tobacco transformants with strongly decreased expression of pyrophosphate:fructose-6-phosphate expression in the base of their young growing leaves contain much higher levels of fructose-2,6-bisphosphate but no major changes in fluxes. *Planta* **214**: 106–116.
- Nielsen, T.H. and Stitt, M.** (2001b). Tobacco transformants with strongly decreased expression of pyrophosphate:fructose-6-phosphate expression in the base of their young growing leaves contain much higher levels of fructose-2,6-bisphosphate but no major changes in fluxes. *Planta* **214**: 106–116.
- Nielsen, T.H. and Wischmann, B.** (1995). Quantitative Aspects of the in Vivo Regulation of Pyrophosphate:Fructose-6-Phosphate 1-Phosphotransferase by Fructose-2,6-Bisphosphate. *Plant Physiol.* **109**: 1033–1038.
- Niittylä, T., Messerli, G., Trevisan, M., Chen, J., Smith, A.M., and Zeeman, S.C.** (2004). A Previously Unknown Maltose Transporter Essential for Starch Degradation in Leaves. *Science* **303**: 87–89.
- Nikkanen, L. and Rintamäki, E.** (2014). Thioredoxin-dependent regulatory networks in chloroplasts under fluctuating light conditions. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **369**: 20130224.
- Nishihira, J., Ishibashi, T., Sakai, M., Nishi, S., Kumazaki, T., Hatanaka, Y., Tsuda, S., and Hikichi, K.** (1992). Characterization of cysteine residues of glutathione S-transferase P: evidence for steric hindrance of substrate binding by a bulky adduct to cysteine 47. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188**: 424–432.

- Ober, E.S. and Sharp, R.E.** (1996). A microsensor for direct measurement of O₂ partial pressure within plant tissues. *J. Exp. Bot.* **47**: 447–454.
- O'Brien, W.E., Bowien, S., and Wood, H.G.** (1975). Isolation and characterization of a pyrophosphate-dependent phosphofructokinase from *Propionibacterium shermanii*. *J. Biol. Chem.* **250**: 8690–8695.
- Ohto, M., Onai, K., Furukawa, Y., Aoki, E., Araki, T., and Nakamura, K.** (2001). Effects of Sugar on Vegetative Development and Floral Transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **127**: 252–261.
- Okuzaki, A., Konagaya, K., Nanasato, Y., Tsuda, M., and Tabei, Y.** (2011). Estrogen-inducible GFP expression patterns in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Rep.* **30**: 529–538.
- Paricharttanakul, N.M., Ye, S., Menefee, A.L., Javid-Majd, F., Sacchettini, J.C., and Reinhart, G.D.** (2005). Kinetic and structural characterization of phosphofructokinase from *Lactobacillus bulgaricus*. *Biochemistry (Mosc.)* **44**: 15280–15286.
- Patel, R.V., Nahal, H.K., Breit, R., and Provart, N.J.** (2012). BAR expressolog identification: expression profile similarity ranking of homologous genes in plant species. *Plant J.* **71**: 1038–1050.
- Paul, M., Sonnewald, U., Hajirezaei, M., Dennis, D., and Stitt, M.** (1995). Transgenic tobacco plants with strongly decreased expression of pyrophosphate: Fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase do not differ significantly from wild type in photosynthate partitioning, plant growth or their ability to cope with limiting phosphate, limiting nitrogen and suboptimal temperatures. *Planta* **196**: 277–283.
- Pego, J.V., Kortstee, A.J., Huijser, C., and Smeekens, S.C.M.** (2000). Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression. *J. Exp. Bot.* **51**: 407–416.
- Perata, P. and Alpi, A.** (1991). Ethanol-induced injuries to carrot cells: the role of acetaldehyde. *Plant Physiol.* **95**: 748–752.
- Perata, P., Pozueta-Romero, J., Akazawa, T., and Yamaguchi, J.** (1992). Effect of anoxia on starch breakdown in rice and wheat seeds. *Planta* **188**: 611–618.
- Perata, P. and Voeselek, L.A.C.J.** (2007). Submergence tolerance in rice requires Sub1A, an ethylene-response-factor-like gene. *Trends Plant Sci.* **12**: 43–46.
- Plaxton, W.C.** (1996). The Organization and Regulation of Plant Glycolysis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 185–214.
- Plaxton, W.C. and Tran, H.T.** (2011). Metabolic Adaptations of Phosphate-Starved Plants. *Plant Physiol.* **156**: 1006–1015.
- Plowman, S.A. and Smith, D.L.** (2013). Exercise Physiology for Health Fitness and Performance (Lippincott Williams & Wilkins).
- Podestá, F.E. and Plaxton, W.C.** (1994). Regulation of cytosolic carbon metabolism in germinating *Ricinus communis* cotyledons. *Planta* **194**: 374–380.
- Ponnamperuma, F.N.** (1972). The Chemistry of Submerged Soils. In *Advances in Agronomy*, N.C. Brady, ed (Academic Press), pp. 29–96.

- Price, J., Li, T.-C., Kang, S.G., Na, J.K., and Jang, J.-C.** (2003). Mechanisms of Glucose Signaling during Germination of Arabidopsis. *Plant Physiol.* **132**: 1424–1438.
- Raskin, I. and Kende, H.** (1984). Role of Gibberellin in the Growth Response of Submerged Deep Water Rice. *Plant Physiol.* **76**: 947–950.
- Rawsthorne, S.** (2002). Carbon flux and fatty acid synthesis in plants. *Prog. Lipid Res.* **41**: 182–196.
- Raymond, P. and Pradet, A.** (1980). Stabilization of adenine nucleotide ratios at various values by an oxygen limitation of respiration in germinating lettuce (*Lactuca sativa*) seeds. *Biochem. J.* **190**: 39–44.
- Reddy, A.R.** (1996). Fructose 2,6-bisphosphate-modulated photosynthesis in Sorghum leaves grown under low water regimes. *Phytochemistry* **43**: 319–322.
- Reichert, A., Baalman, E., Vetter, S., Backhausen, J.E., and Scheibe, R.** (2000). Activation properties of the redox-modulated chloroplast enzymes glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and fructose-1,6-bisphosphatase. *Physiol. Plant.* **110**: 330–341.
- Ricard, B., Rivoal, J., Spiteri, A., and Pradet, A.** (1991). Anaerobic Stress Induces the Transcription and Translation of Sucrose Synthase in Rice. *Plant Physiol.* **95**: 669–674.
- Ricard, B., Toai, T.V., Chourey, P., and Saglio, P.** (1998). Evidence for the Critical Role of Sucrose Synthase for Anoxic Tolerance of Maize Roots using a Double Mutant. *Plant Physiol.* **116**: 1323–1331.
- Roberts, J.K., Callis, J., Jardetzky, O., Walbot, V., and Freeling, M.** (1984). Cytoplasmic acidosis as a determinant of flooding intolerance in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**: 6029–6033.
- Roberts, J.K.M., Chang, K., Webster, C., Callis, J., and Walbot, V.** (1989). Dependence of Ethanol Fermentation, Cytoplasmic pH Regulation, and Viability on the Activity of Alcohol Dehydrogenase in Hypoxic Maize Root Tips 1. *Plant Physiol.* **89**: 1275–1278.
- Rolletschek, H., Borisjuk, L., Koschorreck, M., Wobus, U., and Weber, H.** (2002). Legume embryos develop in a hypoxic environment. *J. Exp. Bot.* **53**: 1099–1107.
- Rozwadowski, K., Yang, W., and Kagale, S.** (2008). Homologous recombination-mediated cloning and manipulation of genomic DNA regions using Gateway and recombineering systems. *BMC Biotechnol.* **8**: 88.
- Ruelland, null and Miginiac-Maslow, null** (1999). Regulation of chloroplast enzyme activities by thioredoxins: activation or relief from inhibition? *Trends Plant Sci.* **4**: 136–141.
- Rung, J.H., Draborg, H.H., Jørgensen, K., and Nielsen, T.H.** (2004). Carbon partitioning in leaves and tubers of transgenic potato plants with reduced activity of fructose-6-phosphate,2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Physiol. Plant.* **121**: 204–214.
- Salminen, S.O. and Young, R.E.** (1975). The control properties of phosphofructokinase in relation to the respiratory climacteric in banana fruit. *Plant Physiol.* **55**: 45–50.

- Sasaki, Y., Kozaki, A., and Hatano, M.** (1997). Link between light and fatty acid synthesis: Thioredoxin-linked reductive activation of plastidic acetyl-CoA carboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 11096–11101.
- Scheibe, R.** (1996). Die Regulation der Photosynthese durch das Licht. *Biol. Unserer Zeit* **26**: 27–34.
- Scheibe, R. and Anderson, L.E.** (1981). Dark modulation of NADP-dependent malate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in the chloroplast. *Biochim. Biophys. Acta* **636**: 58–64.
- Scheibe, R., Fickenscher, K., and Ashton, A.R.** (1986). Studies on the mechanism of the reductive activation of NADP-malate dehydrogenase by thioredoxin m and low-molecular-weight thiols. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **870**: 191–197.
- Scheibe, R., Geissler, A., and Fickenscher, K.** (1989). Chloroplast glucose-6-phosphate dehydrogenase: Km shift upon light modulation and reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* **274**: 290–297.
- Scheibe, R., Wedel, N., Vetter, S., Emmerlich, V., and Sauermann, S.-M.** (2002). Co-existence of two regulatory NADP-glyceraldehyde 3-P dehydrogenase complexes in higher plant chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* **269**: 5617–5624.
- Scholl, R.L., May, S.T., and Ware, D.H.** (2000). Seed and Molecular Resources for Arabidopsis. *Plant Physiol.* **124**: 1477–1480.
- Scholz, R.W., Graham, K.S., Gumprecht, E., and Reddy, C.C.** (1989). Mechanism of Interaction of Vitamin E and Glutathione in the Protection against Membrane Lipid Peroxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **570**: 514–517.
- Scott, P. and Kruger, N.J.** (1995). Influence of Elevated Fructose-2,6-Bisphosphate Levels on Starch Mobilization in Transgenic Tobacco Leaves in the Dark. *Plant Physiol.* **108**: 1569–1577.
- Scott, P., Lange, A.J., and Kruger, N.J.** (2000). Photosynthetic carbon metabolism in leaves of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) containing decreased amounts of fructose 2,6-bisphosphate. *Planta* **211**: 864–873.
- Semenza, G.L. and Wang, G.L.** (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 5447–5454.
- Shirakihara, Y. and Evans, P.R.** (1988). Crystal structure of the complex of phosphofructokinase from *Escherichia coli* with its reaction products. *J. Mol. Biol.* **204**: 973–994.
- Smeekens, S.** (1998). Sugar regulation of gene expression in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**: 230–234.
- Song, S., Dai, X., and Zhang, W.-H.** (2012). A rice F-box gene, OsFbx352, is involved in glucose-delayed seed germination in rice. *J. Exp. Bot.* **63**: 5559–5568.
- Spiro, S. and Guest, J.R.** (1990). FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **6**: 399–428.

- Steffens, B., Kovalev, A., Gorb, S.N., and Sauter, M.** (2012). Emerging Roots Alter Epidermal Cell Fate through Mechanical and Reactive Oxygen Species Signaling. *Plant Cell* **24**: 3296–3306.
- Stitt, M.** (1990). Fructose-2,6-Bisphosphate as a Regulatory Molecule in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**: 153–185.
- Stitt, M.** (1989). Product Inhibition of Potato Tuber Pyrophosphate:Fructose-6-Phosphate Phosphotransferase by Phosphate and Pyrophosphate 1. *Plant Physiol.* **89**: 628–633.
- Stitt, M.** (1998). Pyrophosphate as an Energy Donor in the Cytosol of Plant Cells: an Enigmatic Alternative to ATP. *Bot. Acta* **111**: 167–175.
- Stitt, M., Cseke, C., and Buchanan, B.B.** (1984). Regulation of fructose 2,6-bisphosphate concentration in spinach leaves. *Eur. J. Biochem.* **143**: 89–93.
- Stitt, M. and Vasella, A.** (1988). Biological Action of Phosphonate Analogs of Fructose 2,6-Bisphosphate on Enzymes from Higher-Plants. *FEBS Lett.* **228**: 60–64.
- St-Pierre, J., Brand, M.D., and Boutilier, R.G.** (2000). Mitochondria as ATP consumers: Cellular treason in anoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 8670–8674.
- Stumpp, M.T., Motohashi, K., and Hisabori, T.** (1999). Chloroplast thioredoxin mutants without active-site cysteines facilitate the reduction of the regulatory disulphide bridge on the gamma-subunit of chloroplast ATP synthase. *Biochem. J.* **341**: 157–163.
- Summers, J.E., Ratcliffe, R.G., and Jackson, M.B.** (2000). Anoxia tolerance in the aquatic monocot *Potamogeton pectinatus* absence of oxygen stimulates elongation in association with an unusually large pasteur effect. *J. Exp. Bot.* **51**: 1413–1422.
- Surendranathan, K.K., Iyer, M.G., and Nair, P.M.** (1990). Characterization of a monomeric phosphofructokinase from banana — role of magnesium on its regulation. *Plant Sci.* **72**: 27–35.
- Swarbreck, D. et al.** (2008). The Arabidopsis Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucleic Acids Res.* **36**: D1009–1014.
- Taabazuig, C.Y., Hangasky, J.A., and Knapp, M.J.** (2014). Oxygen sensing strategies in mammals and bacteria. *J. Inorg. Biochem.* **133**: 63–72.
- Tahchy, A.E., Bordage, S., Ptak, A., Dupire, F., Barre, E., Guillou, C., Henry, M., Chapleur, Y., and Laurain-Mattar, D.** (2011). Effects of sucrose and plant growth regulators on acetylcholinesterase inhibitory activity of alkaloids accumulated in shoot cultures of Amaryllidaceae. *Plant Cell Tissue Organ Cult. PCTOC* **106**: 381–390.
- Takehige, K. and Tazawa, M.** (1989). Determination of the inorganic pyrophosphate level and its subcellular localization in *Chara corallina*. *J. Biol. Chem.* **264**: 3262–3266.
- Theodorou, M.E., Cornel, F.A., Duff, S.M., and Plaxton, W.C.** (1992). Phosphate starvation-inducible synthesis of the alpha-subunit of the pyrophosphate-dependent phosphofructokinase in black mustard suspension cells. *J. Biol. Chem.* **267**: 21901–21905.
- Theodorou, M.E. and Kruger, N.J.** (2001). Physiological relevance of fructose 2,6-bisphosphate in the regulation of spinach leaf pyrophosphate:fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase. *Planta* **213**: 147–157.

- Theodorou, M.E. and Plaxton, W.C.** (1994). Induction of PPI-dependent phosphofructokinase by phosphate starvation in seedlings of *Brassica nigra*. *Plant Cell Environ.* **17**: 287–294.
- Theodorou, M.E. and Plaxton, W.C.** (1996). Purification and characterization of pyrophosphate-dependent phosphofructokinase from phosphate-starved *Brassica nigra* suspension cells. *Plant Physiol.* **112**: 343–351.
- Todd, J.F., Blakeley, S.D., and Dennis, D.T.** (1995). Structure of the genes encoding the alpha- and beta-subunits of castor pyrophosphate-dependent phosphofructokinase. *Gene* **152**: 181–186.
- To, J.P., Reiter, W.-D., and Gibson, S.I.** (2002). Mobilization of seed storage lipid by *Arabidopsis* seedlings is retarded in the presence of exogenous sugars. *BMC Plant Biol.* **2**: 4.
- Toki, S., Hara, N., Ono, K., Onodera, H., Tagiri, A., Oka, S., and Tanaka, H.** (2006). Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **47**: 969–976.
- Tremblay, J.M., Li, H., Yarbrough, L.R., and Helmkamp, G.M.** (2001). Modifications of cysteine residues in the solution and membrane-associated conformations of phosphatidylinositol transfer protein have differential effects on lipid transfer activity. *Biochemistry (Mosc.)* **40**: 9151–9158.
- Trevanion, S.J.** (2000). Photosynthetic carbohydrate metabolism in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves: optimization of methods for determination of fructose 2,6-bisphosphate. *J. Exp. Bot.* **51**: 1037–1045.
- Truesdale, M.R., Toldi, O., and Scott, P.** (1999). The Effect of Elevated Concentrations of Fructose 2,6-Bisphosphate on Carbon Metabolism during Deacidification in the Crassulacean Acid Metabolism Plant *Kalanchoe daigremontiana*. *Plant Physiol.* **121**: 957–964.
- Turner, J.S.** (1951). Respiration The Pasteur Effect in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **2**: 145–168.
- Turner, W.L. and Plaxton, W.C.** (2003). Purification and characterization of pyrophosphate- and ATP-dependent phosphofructokinases from banana fruit. *Planta* **217**: 113–121.
- Ullah, H., Chen, J.-G., Wang, S., and Jones, A.M.** (2002). Role of a Heterotrimeric G Protein in Regulation of *Arabidopsis* Seed Germination. *Plant Physiol.* **129**: 897–907.
- Umeda, M. and Uchimiya, H.** (1994). Differential Transcript Levels of Genes Associated with Glycolysis and Alcohol Fermentation in Rice Plants (*Oryza sativa* L.) under Submergence Stress. *Plant Physiol.* **106**: 1015–1022.
- van der Merwe, M.J., Groenewald, J.-H., Stitt, M., Kossmann, J., and Botha, F.C.** (2010). Downregulation of pyrophosphate: D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase activity in sugarcane culms enhances sucrose accumulation due to elevated hexose-phosphate levels. *Planta* **231**: 595–608.
- Vashisht, D., Hesselink, A., Pierik, R., Ammerlaan, J.M.H., Bailey-Serres, J., Visser, E.J.W., Pedersen, O., van Zanten, M., Vreugdenhil, D., Jamar, D.C.L., Voesenek, L. a. C.J., and Sasidharan, R.** (2011). Natural variation of submergence tolerance among *Arabidopsis thaliana* accessions. *New Phytol.* **190**: 299–310.

- Visser, E.J.W. and Bögemann, G.M.** (2006). Aerenchyma formation in the wetland plant *Juncus effusus* is independent of ethylene. *New Phytol.* **171**: 305–314.
- Visser, E.J.W., Bögemann, G.M., Blom, C.W.P.M., and Voesenek, L.A.C.J.** (1996). Ethylene accumulation in waterlogged *Rumex* plants promotes formation of adventitious roots. *J. Exp. Bot.* **47**: 403–410.
- Vriezen, W.H., Zhou, Z., and Van Der Straeten, D.** (2003). Regulation of Submergence-induced Enhanced Shoot Elongation in *Oryza sativa* L. *Ann. Bot.* **91**: 263–270.
- Wassmann, R., Jagadish, S.V.K., Heuer, S., Ismail, A., Redona, E., Serraj, R., Singh, R.K., Howell, G., Pathak, H., and Sumfleth, K.** (2009). Chapter 2 Climate Change Affecting Rice Production: The Physiological and Agronomic Basis for Possible Adaptation Strategies. In *Advances in Agronomy*, D.L. Sparks, ed (Academic Press), pp. 59–122.
- Weather and Rice: Proceedings of the International Workshop on The Impact of Weather Parameters on Growth and Yield of Rice, 7-10 Apr 1986** (1987). (Int. Rice Res. Inst.).
- Wehner, N.** Etablierung und Anwendung molekularer Methoden zur Analyse des *Arabidopsis thaliana* Transkriptionsfaktor-ORFeoms, Establishment and application of molecular tools to analyse the *Arabidopsis thaliana* transcription factor ORFeome.
- Weigel, D. and Glazebrook, J.** (2002). *Arabidopsis: A Laboratory Manual* (CSHL Press).
- Weiner, H., Stitt, M., and Heldt, H.W.** (1987). Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **893**: 13–21.
- Weise, S.E., Weber, A.P.M., and Sharkey, T.D.** (2004). Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. *Planta* **218**: 474–482.
- Wenderoth, I., Scheibe, R., and von Schaewen, A.** (1997). Identification of the cysteine residues involved in redox modification of plant plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **272**: 26985–26990.
- Wendt, U.K., Wenderoth, I., Tegeler, A., and Von Schaewen, A.** (2000). Molecular characterization of a novel glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J.* **23**: 723–733.
- Wheeler, D.L., Church, D.M., Federhen, S., Lash, A.E., Madden, T.L., Pontius, J.U., Schuler, G.D., Schriml, L.M., Sequeira, E., Tatusova, T.A., and Wagner, L.** (2003). Database resources of the National Center for Biotechnology. *Nucleic Acids Res.* **31**: 28–33.
- Winkler, C., Delvos, B., Martin, W., and Henze, K.** (2007). Purification, microsequencing and cloning of spinach ATP-dependent phosphofructokinase link sequence and function for the plant enzyme. *FEBS J.* **274**: 429–438.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V., and Provart, N.J.** (2007). An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS ONE* **2**: e718.
- Wong, J.H., Kiss, F., Wu, M.X., and Buchanan, B.B.** (1990). Pyrophosphate Fructose-6-P 1-Phosphotransferase from Tomato Fruit : Evidence for Change during Ripening. *Plant Physiol.* **94**: 499–506.

- Wong, J.H., Yee, B.C., and Buchanan, B.B.** (1987). A Novel Type of Phosphofructokinase from Plants. In *Progress in Photosynthesis Research*, J. Biggins, ed (Springer Netherlands), pp. 487–490.
- Wong, J.W.H., Ho, S.Y.W., and Hogg, P.J.** (2011). Disulfide bond acquisition through eukaryotic protein evolution. *Mol. Biol. Evol.* **28**: 327–334.
- Xu, K., Xu, X., Fukao, T., Canlas, P., Maghirang-Rodriguez, R., Heuer, S., Ismail, A.M., Bailey-Serres, J., Ronald, P.C., and Mackill, D.J.** (2006). Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature* **442**: 705–708.
- Xu, P. et al.** (2011). Genome-wide essential gene identification in *Streptococcus sanguinis*. *Sci. Rep.* **1**.
- Yanovsky, M.J. and Kay, S.A.** (2002). Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. *Nature* **419**: 308–312.
- Yan, T.F. and Tao, M.** (1984). Multiple forms of pyrophosphate:D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase from wheat seedlings. Regulation by fructose 2,6-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **259**: 5087–5092.
- Zaffagnini, M., Michelet, L., Marchand, C., Sparla, F., Decottignies, P., Le Maréchal, P., Miginiac-Maslow, M., Noctor, G., Trost, P., and Lemaire, S.D.** (2007). The thioredoxin-independent isoform of chloroplastic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is selectively regulated by glutathionylation. *FEBS J.* **274**: 212–226.
- Zakhleniuk, O.V., Raines, C.A., and Lloyd, J.C.** (2001). *pho3*: a phosphorus-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* **212**: 529–534.
- Zeng, L., Shannon, M.C., and Lesch, S.M.** (2001). Timing of salinity stress affects rice growth and yield components. *Agric. Water Manag.* **48**: 191–206.
- Zeng, Y., Wu, Y., Avigne, W.T., and Koch, K.E.** (1998). Differential Regulation of Sugar-Sensitive Sucrose Synthases by Hypoxia and Anoxia Indicate Complementary Transcriptional and Posttranscriptional Responses. *Plant Physiol.* **116**: 1573–1583.
- Zeng, Y., Wu, Y., Avigne, W.T., and Koch, K.E.** (1999). Rapid repression of maize invertases by low oxygen. Invertase/sucrose synthase balance, sugar signaling potential, and seedling survival. *Plant Physiol.* **121**: 599–608.
- Zheng, L., Baumann, U., and Reymond, J.-L.** (2004). An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res.* **32**: e115.
- Zhu, G., Ye, N., and Zhang, J.** (2009). Glucose-induced delay of seed germination in rice is mediated by the suppression of ABA catabolism rather than an enhancement of ABA biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* **50**: 644–651.

6 Anhang

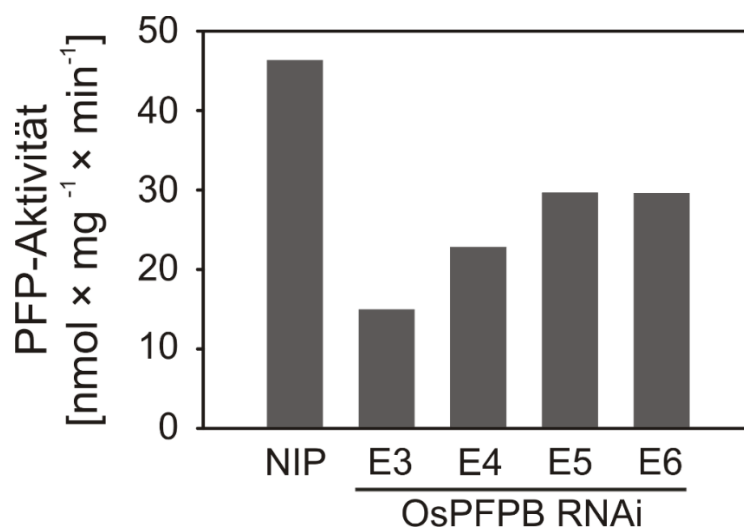


Abbildung 40: Enzymaktivität im Kallusgewebe *OsPFPβ* RNAi-Linien E3 bis E6. Für die Bestimmung der Enzymaktivität wurde aus 10 Tage altem Kallusgewebe von *OsPFPβ* RNAi-Linien E3 bis E6 und dem *Oryza sativa* ssp. Japonica cv. Nipponbare (NIP) das Gesamtprotein extrahiert und die PFP/PFK-Aktivität bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (n=1 -3).

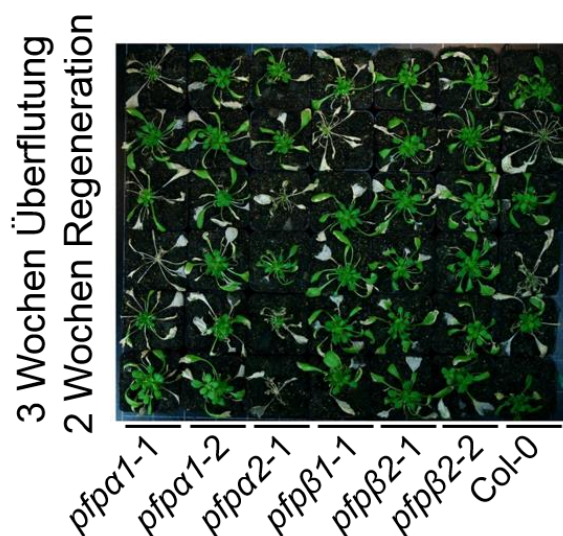


Abbildung 41: Überlebensexperiment ausgewählter *Arabidopsis thaliana* T-DNA-Insertionsmutanten und Col-0 nach 3 wöchiger Überflutung. Abgebildet sind Pflanzen der T-DNA-Insertionsmutanten *pfpα1-1*, *pfpα1-2*, *pfpα2-2*, *pfpβ1-1*, *pfpβ2-1*, *pfpβ2-2* und Col-0 nach drei Wochen kompletter Überflutung und 2 Wochen.

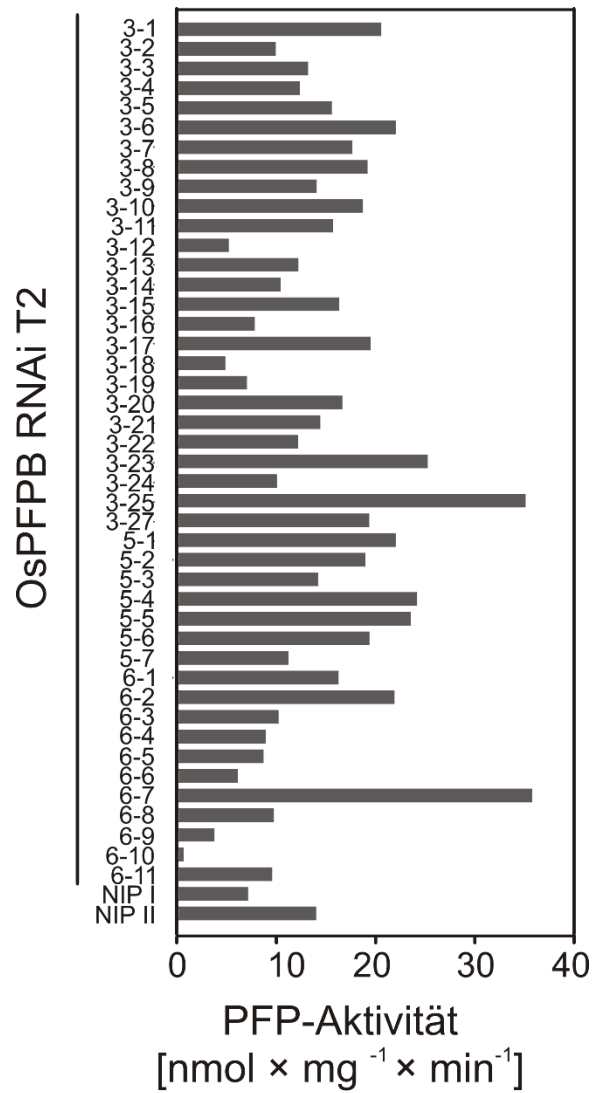


Abbildung 42: PFP-Aktivität ausgewählter *OsPFPβ* RNAi-Linien der T2-Generation. Dargestellt ist die PFP-Aktivität aus 21 Tage alten Pflanzen der *OsPFPβ* RNAi-Linien und dem Nipponbare Wildtyp (NIP) (n=1).



Abbildung 43: Phänotypisierung der PFK5 RNAi Mutanten 1-1, 8-6 und 11-11. Abgebildet sind 7 Tage alte Keimlinge und 5 Wochen alte Pflanzen des Wildtyps Col-0 und den PFK5 RNAi Mutanten 1-1, 8-6 und 11-11. Die Pflanzen wurden auf 1-fach MS und 1 % [w/v] Saccharose unter Kurztagbedingungen angezogen, anschließend auf Erde transferiert und weitere 4 Wochen unter Kurztagbedingungen angezogen.

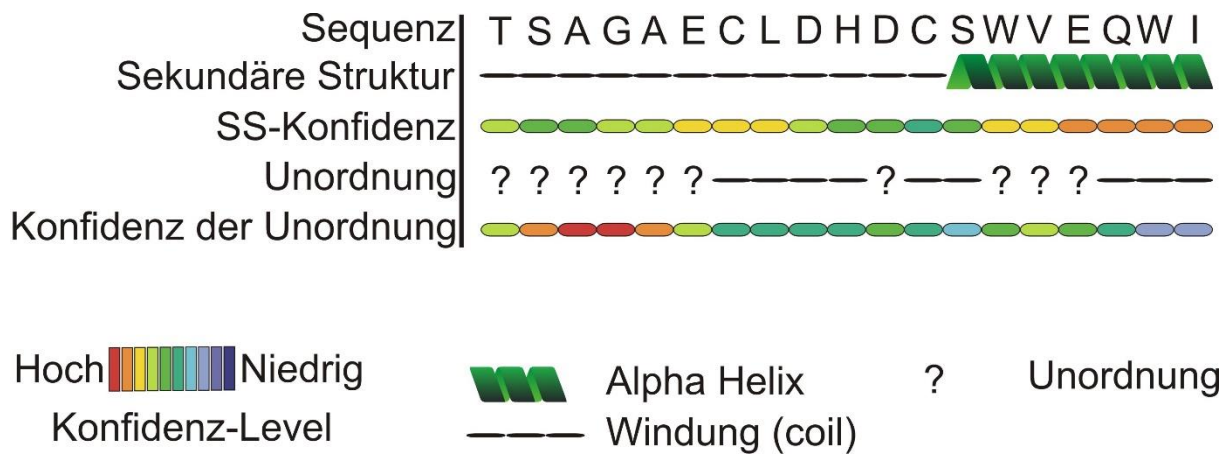


Abbildung 44: Vorhersage der sekundären Proteinstruktur und Proteinunordnung für das CXXXXC-Motiv von PFK5. Dargestellt ist ein Ausschnitt der PFK5 Sequence inklusive des CXXXXC-Motivs. Farblich unterschieden wird das Konfidenzniveau der Proteinunordnung sowie der Sekundärstruktur.

Tabelle 4: Aufgelistet ist eine Übersicht der zur Herstellung von Punktmutationen verwendeten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz
pGEMT_revcl	TATTTCTAGAGGTACCGCGGGATATCACTAGTGCG
pGEMT_fwcl	TTATTCTAGAGGATCCGGCCGGGAGCATGCGACGT
AtPFK5_KpnI_fw	AAGGTACCATGGATGCTCTTTCTCAGGCG
AtPFK5_XbaI_rev	TATTCTAGATTAGATGAAATCGGGTTGGCCC
AtPFK3_KpnI_fw	AATAGGTACCATGAGTACTGTGGAGAGTAG
AtPFK3_BamHI_rev	AATTGGATCCTCACTTGGTGATCTCTTTGG
AtPFK5m_XbaI_rev	TATTCTAGATTAGATGAAATCGGGTTGCCCC
PFK5_C152S	TTCTGCTGGAGCTGAGAGCCTTGATCATGACTG
PFK5_C152S_antisense	CAGTCATGATCAAGGCTCTCAGCTCCAGCAGAA
PFK5_C157S	GAGTGCCTTGATCATGACAGTTCTTGGGTTGAACAAT
PFK5_C157S_antisense	ATTGTTCAACCCAAGAACTGTCATGATCAAGGCACTC
PFK5_C187S	AAGCTGCGATTATCACTAGTGGTGGCCTTTGCC
PFK5_C187S_antisense	GGCAAAGGCCACCACTAGTGATAATCGCAGCTT
PFK5_C191S	TTATCACTAGTGGTGGCCTTAGCCCTGGTCTC
PFK5_C191S_antisense	GAGACCAGGGCTAAGGCCACCACTAGTGATAA
PFK5_C373S	GTGGACAAGTCGACATCAGTTTGATTCTGAGGTT
PFK5_C373S_antisense	AACCTCAGGAATCAAACCTGATGTCGACTTGTCCAC

PFK5_C475S	TCGGATGGTATCCTCAGCACCGTTCTTGGAC
PFK5_C475S_antisense	GTCCAAGAACGGTGCTGAGGATACCATCCGA
PFK3_C95S	ATGCTTGCATAGTTACCACTGGAGGTCTTTGTCCT
PFK3_C95S_antisense	AGGACAAAGACCTCCACTGGTAACTATGCAAGCAT
PFK3_C99S	CATAGTTACCTGTGGAGGTCTTAGTCCTGGCCTTA
PFK3_C99S_antisense	TAAGGCCAGGACTAAGACCTCCACAGGTAAGTATG
PFK3_C103S	CATAGTTACCACTGGAGGTCTTAGTCCTGGCCTTA
PFK3_C103S_antisense	TAAGGCCAGGACTAAGACCTCCACTGGTAACTATG
PFK3_C283S	CAAGCAGAGATGTGGACAGCAGTTTGATTCCGGAGTA
PFK3_C283S_antisense	TGACTCCGGAATCAAACCTGCTGTCCACATCTCTGCTTG
PFK3_C390S	GCAATGCGTCAGACAATGTTTATAGTACACTTCTGGC
PFK3_C390S_antisense	GCCAGAAGTGTACTATAAACATTGTCTGACGCATTGC
PFK3_Q448E	TACTCTCTTCGACAAACGAGCCGAGTTTCTTGGG
PFK3_Q448E_antisense	CCCAAGAACTCGGCTCGTTTGTCAAGAGAGTA
PFK3n_C95S	AATCTGATGAAGTGCATGCTAGCATAGTTACCTGTGG
PFK3n_C95S_antisense	CCACAGGTAAGTATGCTAGCATGCACTTCATCAGATT

Tabelle 5: Aufgelistet ist eine Übersicht der zur Herstellung der RNAi-Konstrukte und HA-Klonierung verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
PFPB_RNAi_GW_fw	AAAAAGCAGGCTCGTGCTGCTTCTCACATTACA
PFPB_RNAi_GW_rev2	AGAAAGCTGGGTCCTGAACATTTCCATGAGGAT
AtPFK5_RNAi_fw	AAAAAGCAGGCTAGTCTTCTTCTCTCGTTCCTTC
AtPFK5_RNAi_rev	AGAAAGCTGGGTTGTAGGTGAGGAGTAACTAATAAC
PFK_Try_fw_KpnI	AATAGGTACCATGGCCGTTGAATCTCGCAGC
PFK_Try_rev_BamHI	AATTGGATCCTTACAGTTCCTCGTGGAGGCGGTC
attB1_rev	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
attB1_rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT
PFK_HA-tag_fw	GGATCAGGTACCAACAATGGC
PFK_HA-tag_rev	AAATGGTACCTGCATAGTCCGGGACGTCA
cHA-PFK_fw	TATTACTAGTAACATCTTTTACCCATACG
cHA-PFK_rev	TTATAAGCTTCCCGATCTAGTAACATAGATG

Tabelle 6: Aufgelistet ist eine Übersicht der für Expressionsanalysen und zur Gentypisierung der T-DNA-Insertionslinien verwendeten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz
AtPFK1_fw	ATTTCTCCGACGACTTTCCTG
AtPFK1_rev	CCTTTCTGTGATCCATCTCCA
AtPFK2_fw	ATCAGGAAGCTCCCATCTCTC
AtPFK2_rev	TTGGGATCATCTCTTGACCTG
AtPFK3_fw	TGGAGAGTAGCAAACCGAAGA
AtPFK3_rev	AGGATAGTCCCTCCACGCTTA
AtPFK4h_fw	TGGAAAATGGAGTTGGTATCG
AtPFK4h_rev	GATTTGTCGATGCAAGGAGTC
AtPFK6h_fw	CCAAAAACCATTGACAACGAC
AtPFK6h_rev	TTGGGCAAGGAGAGTTGAGTA
AtPFK7_fw	CGAGAAGTAACAAGCCGAAGA
AtPFK7_rev	TCAACATGTGCTGCGTTAATC
Tub_ATH_fw	CTCAAGAGGTTCTCAGCAGTA
Tub_ATH_rev	TCACCTTCTTCATCCGCAGTT
hph_fw	AGTACTTCTACACAGCCATCG
hph_rev	GTTATGTTTATCGGCACTTTG
OsActin_fw_new	GAGCAGGAGCTGGAACTTCT
OsActin_rev_new	ATCATACTCGCCCTTGAGAT
GFPPriv_fw	CTGACCCTGAAGTTCATCTGC
GFPPriv_rev	GGTGCTCAGGTAGTGGTTGTC
PFP-RB	ATACAACAAGGCCTCAAACA
PFPB_rev3	CCTCCTCTCAACATCCATCAA
PB_all	ATCCAGACTGAATGCCAC
AtPFPA1_fw	TGGTTATGATTTGCTCGGAAG
AtPFPA1_rev	TGACCAAGGTGAGAGCTGAGT
AtPFPA2_fw2	CGTGCCTTCCCACATACTCTA
AtPFPA2_rev	CCCATGAGACGGACAAAGTAA
GK_LB	ATATTGACCATCATACTCATTGC
AtPFPB1_fw	CAGTGGGAAGACCGGACTAAT

AtPFPB1_rev	GCCCCGAGTTCAAGAAGTAGA
AtPFPB2h_fw	ACGGTGTCATTCTTGTTTCCTG
AtPFPB2h_rev	ATCCATCAACGAAGTCAGTGC
PF2K_fw	TCAGCTTCTGGTTCATTCGT
PF2K_rev	CAAGTGCTGCTACCTCAGTCC
LBb1(T3)	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT
Tabak_Tub_fw	TTCAAGGATTCCAGGTGTGTC
Tabak_Tub_rev	CTGAGGCAGTGAGGTAACGAC

Danksagung

Zuerst danke ich Frau Prof. Dr. Angelika Mustroph für das Vertrauen, das sie mir mit der Aufnahme in die Arbeitsgruppe entgegengebracht hat und die Unterstützung, sowie fachliche Beratung während der gesamten Promotionsarbeit.

Ich danke allen, die mit mir zusammengearbeitet und somit zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere Erica Vendrame, Aljona Hertlein, Jonas Giese, Johanna Stock, Kerstin Krause, Simon Richter, Christian Hofmann und Pia Schuster.

Darüber hinaus möchte ich mich ebenfalls bei allen Laborkollegen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die stimulierenden fachlichen Diskussionen bedanken.

Eidesstattliche Versicherung und Erklärung

(§ 5 Nr. 4 PromO)

Hiermit erkläre ich, dass keine Tatsachen vorliegen, die mich nach den gesetzlichen Bestimmungen über die Führung akademischer Grade zur Führung eines Doktorgrades unwürdig erscheinen lassen.

(§ 8 S. 2 Nr. 5 PromO)

Hiermit erkläre ich mich damit einverstanden, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung hinsichtlich der eigenständigen Anfertigung der Dissertation unterzogen werden kann.

(§ 8 S. 2 Nr. 7 PromO)

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

(§ 8 S. 2 Nr. 8 PromO)

Ich habe die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades anderweitig eingereicht und habe auch nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden.

(§ 8 S. 2 Nr. 9 PromO)

Hiermit erkläre ich, dass ich keine Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern in Anspruch genommen habe und auch künftig nicht nehmen werde.

.....

Ort, Datum, Unterschrift

